

Procurando dados locais, com relação a casos de intoxicações por enterotoxina estafilocócica tendo como alimento veiculador o leite, não conseguimos informações registradas. Talvez, os casos passem despercebidos ou recebam outro diagnóstico.

Achamos da mais alta importância, realizarem-se estudos sobre esta problemática de grande significado em Saúde Pública, a fim de conhecer sua magnitude e propor-se medidas cabíveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Médicos Veterinários Candido Abela Porto, José Antonio P. Schenk, João Carlos M. Alves Pereira pela co-
operação recebida. Ao Auxiliar de Laboratório José Luis Gullo de Matos, por sua dedicação.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDERSON, P.H.R. & STONE, D.M. Staphylococcal Food Poisoning Associated with Spray-Dried Milk. *J. Hyg.* 43: 387, 1955.
- 2 — ARMIJO, R., HENDERSON, D.A., TIMOTHEE, R. & ROBINSON, H.B. Food Poisoning Outbreaks Associated with Spray-Dried Milk — An Epidemiological Study. *Amer. J. Public Health* 47: 1093, 1957.
- 3 — BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. Edições Melhoramentos, 8.^a Edição, 1957.
- 4 — BLACKBURN, P.S. Reviews of the Progress of Dairy Science. Section E. Diseases of Dairy Cattle. *J. Dairy Res.* 25: 486, 1958.
- 5 — McDIVITT, M.E. & TOPP, E.B. Comparison of Several Selective Media for Isolation and Differentiation of Coagulase-Positive Strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 12: 169, 1964.
- 6 — MORRISON, R. B. The coagulase test in the identification of pathogenic staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 432-35, 1962.
- 7 — ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Normas para para el Examen de los Productos Lacteos. Publicaciones Cientificas, N.º 84, 1963.
- 8 — PACKER, R. A. Six-Year Summary of Laboratory Diagnosis of Mastitis in Iowa. *North Amer. Vet.* 33: 777, 1952.
- 9 — RUFFO, G. Terreno per l'isolamento e la contemporanea identificazione degli stafilococchi coagulasi-positivi dal latte mastitico. *Boll. Ist. Sieroti Milan* 46: 117, 1967.
- 10 — SCHENK, J.A. Comunicação pessoal.
- 11 — SETO, J.T. & WILSON, J.B. Bacteriophage Typing of Micrococci of Bovine Origin. *J. Amer. Vet. Res.* 19: 241, 1958.
- 12 — STONE, R. V. Staphylococcus Food Poisoning and Dairy Products. *J. Milk Tech.* 6: 7, 1943.
- 13 — THATCHER, F.S. & SIMON, W. apud KOCUR, M., PRECECHTL, F & MARTINEC, T. Haemolysins in coagulase-negative Staphylococci. *J. Path. Bact.* 92 (2): 331-6, 1966.
- 14 — TURNES, G.C. & ROSSI, L.L. Aislamento de Coryne Bacterium Bovis de vaca en la República Oriental del Uruguay. *Revista Annales de la Facultad de Veterinaria* 12: 1, 1970.

INFLUENCIA DE MEIOS DE CULTURA E REGIME LUMINOSO NA ESPORULAÇÃO DE *CERCOSPORA SOJINA* HARA. *

Effect of light and substrate on the sporulation of *Cercospora sojina* Hara.

Peri Veiga **

Hiroshi Kimati ***

RESUMO

Dois isolados de *Cercospora sojina* Hara foram cultivados em diferentes condições de meio de cultura e regime luminoso. Observando-se que a esporulação foi melhor em V-8 agar (V-8 A) e farinha de aveia agar (FAA) do que em batata dextrose agar (BDA) e folhas de cenoura agar (FCA).

A esporulação em luz (Fluorescente G.E. 40 Watts) e escuro alternados foi melhor do que em luz e escuro contínuos.

O isolado 1 esporulou, em geral, melhor do que o isolado 2.

SUMMARY

Two isolates of *Cercospora sojina* Hara were cultivated under different conditions of substrate and light. It was concluded that sporulation (conidia) was better in V-8 agar and oatmeal agar than in potato dextrose agar and carrot agar (extract of leaves). Sporulation in light (Fluorescent G.E. 40 watts) and dark alternating was better than continuous light or continuous darkness. Isolate 1, in general, sporulated better than isolate 2.

INTRODUÇÃO

O fungo da mancha "olho de rã", *Cercospora sojina* Hara, foi originalmente descrito em 1915 por Hara, no Japão, e posteriormente, por Miura, em 1921, que o denominou *Cercospora daizu* Miura (ATHOW & PROBST (1); SHERWIN & KREITLOW (6). Nos Estados Unidos, embora os sintomas já tivessem sido observados por alguns autores, sua presença só foi comprovada em 1928 por LEHMAN (4). Nesse trabalho o autor fez uma descrição completa da doença e do agente patogênico, relatando que o fungo esporula facilmente nos meios de cultura que suportam crescimento normal.

No Brasil a *C. sojina* foi constatada pela primeira vez em 1971, no Paraná, por YORINORI (10), sendo sua incidência comprovada no Rio Grande do Sul, em 1973, por REIS & KIMATI (5).

Exceto a referência de LEHMAN (4) sobre a esporulação de *C. sojina*, nada mais foi encontrado na bibliografia sobre as condições que favorecem a esporulação deste fungo.

* Parte do trabalho apresentado para obtenção do título de Mestre. na ESALQ, Piracicaba, SP.

** Prof. Assistente do Depto. de Fitotecnia, CCR — UFSM.

*** Prof. Assistente do Depto. de Fitopatologia da ESALQ.

Em vista da importância da padronização do inóculo em trabalhos de avaliação da resistência e no estudo da variabilidade do patógeno, fica demonstrada a necessidade de trabalhos que forneçam dados quantitativos da esporulação deste fungo.

O presente trabalho tem por objetivo o conhecimento de alguns fatores que afetam a produção de esporos de *C. soja* em meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" — USP — Piracicaba, no período compreendido entre maio e julho de 1973.

Foram usados 2 isolados de *C. soja*: 1 — Obtido da variedade Bragg, pelo Eng.º Agr.º J. T. Yorinori, no Paraná; 2 — Obtido da variedade Halle — 7, pelo Eng.º Agr.º E. M. Reis, no Rio Grande do Sul.

Os isolados foram mantidos por repicagens sucessivas em BDA, inclinado em tubo de ensaio, de onde foram retirados para instalação dos ensaios.

Foram instalados 3 ensaios: I — Influência do regime luminoso na esporulação do isolado 1 de *C. soja*, em meio BDA; II — Influência de meios de cultura na esporulação dos isolados 1 e 2 de *C. soja* e III — Influência do regime luminoso na esporulação dos isolados 1 e 2 de *C. soja*, em meio V-8 A.

O ensaio I foi delineado em experimento inteiramente casualizado e com 3 repetições. Foi conduzido em tubos de ensaio Pyrobras de 15 mm x 150 mm, contendo 5 ml de BDA inclinado. O pH do meio foi ajustado para 5,5 a 6,0 antes da autoclavagem. A transferência do fungo foi feita colocando-se uma gota de uma suspensão de esporos e micélio no meio de cultura, inclinando-se o tubo para que a suspensão tivesse uma distribuição uniforme em toda a superfície do meio. Esta suspensão foi obtida pela adição de 3 ml de água esterilizada em tubo de ensaio contendo o fungo crescendo em BDA inclinado e friccionando-se a superfície da cultura com uma alça de platina, flambada.

Logo após a transferência do fungo, os tubos de ensaio foram colocados em uma Biotronette Mark III, à 25 cm de distância de dois tubos fluorescentes General Electric de 40 Watts, e a uma temperatura de 25º a 27ºC. Deste modo os tubos foram submetidos aos seguintes tratamentos: luz contínua; 12h de luz x 12h de escuro; 9h de luz x 15h de escuro; 6h de luz x 18h de escuro e escuro contínuo, durante 10 dias. Os tratamentos no escuro foram obtidos enrolando-se os tubos de ensaio em folhas de alumínio.

O ensaio II teve o delineamento em experimento inteiramente casualizado e com 5 repetições. Cada repetição constou de 25 ml de meio agarizado esterilizado em erlenmeyer Pyrex de 250 ml.

Os meios de cultura usados foram: batata dextrose agar (BDA), farinha de aveia agar (FAA), folhas de cenoura agar (FCA) e suco V-8 agar (V-8 A), preparados conforme TUIE (9), com exceção do FCA que foi modificado pela adição de 5 g de dextrose por litro e foi autoclavado durante 20 minutos sob 1,5 atm de pressão, como os demais. Todos os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,5 a 6,0 antes da autoclavagem.

A transferência do fungo foi feita colocando-se 1 ml da suspensão de esporos e micélio, por erlenmeyer, com auxílio de uma seringa dosadora. Os erlenmeyers foram colocados em Biotronette do mesmo modo que no ensaio I. O regime luminoso usado foi de 9h de luz x 15h de escuro, durante 10 dias, sendo o tratamento no escuro dado cobrindo-se a frente da Biotronette e desligando-se as fontes de luz.

O ensaio III foi delineado em experimento inteiramente casualizado com 4 repartições e conduzido do mesmo modo que o ensaio II.

O meio de cultura usado foi o V-8 A e foram dados os seguintes tratamentos: luz contínua, 9h de luz x 15h de escuro e escuro contínuo, sendo os tratamentos no escuro, obtidos enrolando-se os erlenmeyers com folhas de alumínio.

A avaliação dos ensaios foi feita contando-se os esporos de suspensões obtidas pela adição de solução de Twenn 80 a 1% nos tubos ou erlenmeyers, que foram agitados vigorosamente para desalojar os esporos dos esporóforos. As contagens de esporos nas suspensões foram feitas com seis amostragens com hemocitômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados apresentados nos quadros 1 e 3 evidencia uma acentuada inibição da esporulação de *C. soja* pela luz e escuros contínuos, tanto em BDA como em V-8A. Essa inibição não tinha sido citada na bibliografia consultada. No entanto, resultados semelhantes foram obtidos para *C. beticola* quando submetida a esses tratamentos por CALPOUZOS & STALLKNECHT (2). Embora usando lâmpadas incandescentes de 40 watts, esses autores observaram uma inibição da esporulação quando o fungo era submetido a luz contínua, inibição parcial sob escuro contínuo e o máximo de esporulação sob condições alternadas de luz e escuro.

A inibição parcial da esporulação sob condições de escuro contínuo, foi observada para onze espécies de *Cercospora* por KILPATRIK & JOHNSON (3) e também para *C. nicotiana* e *C. arachidicola* por STAVELY & NIMMO (8) e SMITH (7), respectivamente, entretanto, ao contrário de *C. soja* e *C. beticola*, a luz contínua estimulou a esporulação, tanto de *C. nicotiana* como de *C. arachidicola*, sendo, inclusive, recomendada para obtenção de inóculo destes dois fungos.

Quadro 1 — Influência do regime luminoso na esporulação do isolado 1 de *Cercospora soja*, em meio BDA.

Tratamentos			Número de esporos ($\times 10^4$) por tubo de ensaio (*)			
horas de luz	x	horas de escuro	Repetições			Médias
			I	II	III	
24	x	00 (**)
12	x	12	16,80	12,00	13,50	14,10
09	x	15	16,50	19,80	18,90	18,39
06	x	18	9,90	9,60	11,40	10,30
00	x	24	4,50	2,40	3,00	3,30

(*) Média de seis amostragens por parcela.

(**) Neste tratamento o fungo não produziu esporos.

Quadro 2 — Influência de meios de cultura na esporulação dos isolados 1 e 2 de *Cercospora sojina*.

Isolados (**)	Meios	Número de esporos (x 10 ⁴) por erlenmeyer (*)					Médias
		Repetições					
		I	II	III	IV	V	
1	V-8A	698,80	606,80	481,60	640,00	541,60	593,76
	FAA	355,20	608,40	546,80	620,00	463,20	518,72
	BDA	247,60	253,40	296,60	280,80	242,60	264,20
2	FCA	46,70	74,60	58,30	47,50	66,80	58,76
	V-8A	328,80	518,70	422,40	562,50	654,90	497,40
	FAA	560,00	413,20	395,20	556,80	470,00	479,04
	BDA	132,60	211,20	178,40	168,40	171,60	172,44
	FCA	21,30	11,70	33,80	49,60	19,60	27,20

(*) Média de seis amostragens por parcela.

(**) 1 — Isolado do Paraná.

2 — Isolado do Rio Grande do Sul.

Os resultados do quadro 3 evidenciam ainda, que embora os dois isolados tenham tido sua esporulação inibida pela luz e escuro contínuos, esta inibição foi mais acentuada no isolado 1 do que no isolado 2, indicando, desse modo, a influência da variabilidade genética nessas reações.

A análise estatística evidencia que os resultados apresentados no quadro 2, onde os dois isolados de *C. sojina* produziam esporos nos meios BDA, FAA, FCA e V-8 A, concordam com a afirmativa de LEHMAN (4) de que diferentemente de outros fungos do gênero *Cercospora*, este fungo esporula facilmente em meios de cultura. Entretanto, a quantidade de esporos produzida nos diferentes meios foi altamente variável, permitindo destacar meios como o V-8 A e FAA, onde facilmente se obtém grandes quantidades de esporos, possibilitando, desse modo, inoculações controladas em muitas plantas ao mesmo tempo. Além disso, as diferenças nas quantidades de esporos produzidas pelos isolados, indicam que a capacidade de esporulação deste fungo depende de sua variabilidade genética.

Quadro 3 — Influência do regime luminoso na esporulação dos isolados 1 e 2 de *Cercospora sojina*.

Isolados (**)	Tratamentos (***)	Número de esporos (x 10 ⁴) por erlenmeyer (*)				Médias
		Repetições				
		I	II	III	IV	
1	L. C.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L. A.	83,00	127,00	124,00	49,00	97,75
	E. C.	7,70	3,50	2,60	4,00	4,45
2	L. C.	1,00	0,00	0,00	0,10	0,27
	L. A.	20,00	28,00	81,00	34,00	40,75
	E. C.	17,00	13,00	12,00	25,00	16,75

(*) Média de seis amostragens por parcela.

(**) 1 — Isolado do Paraná.

2 — Isolado do Rio Grande do Sul.

(***) L. C. — Luz contínua.

L. A. — 9 horas de luz x 15 horas de escuro

E. C. — Escuro contínuo.

Embora ainda não tivesse sido comprovada para *C. sojina*, a capacidade indutora da esporulação, do meio V-8 A, já era conhecida para muitas espécies de fungos (TUIE (9)). O meio FAA, ainda que não fossem encontradas referências sobre sua capacidade como indutor da esporulação no gênero *Cercospora*, foi tão eficiente neste particular quanto o meio V-8 A, podendo substituí-lo com vantagens, pois V-8 é um produto importado, nem sempre sendo encontrado no mercado nacional.

O meio FCA indicado por KILPATRICK & JOHNSON (3) para esporulação de diversas espécies do gênero *Cercospora*, embora tenha sido o que menor esporulação induziu, não perdeu completamente sua capacidade indutora da esporulação pela autoclavagem sob 1,5 atm de pressão, conforme citado pelos referidos autores. Essa discordância de resultados pode ser atribuída à modificação introduzida ao meio (adição de dextrose) ou pelo comportamento de *C. sojina* em relação às espécies estudadas por aqueles autores.

CONCLUSÕES

Para obtenção de inóculo de *Cercospora sojina* Hara é preciso considerar que a sua esporulação, entre outros fatores, depende:

1 — Do meio de cultura empregado.

2 — Do fotoperíodo.

3 — Da capacidade inerente de esporulação do isolado.