

ADELAIDE SIQUEIRA SILVA

PERCLORETO DE FERRO COMO SINALIZADOR DE INJÚRIAS EM
TUBÉRCULOS DE BATATA E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Pectobacterium spp.

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia,
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação
em Agronomia – Doutorado, área de concentração em
Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

Co-orientadora

Prof^a. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

ADELAIDE SIQUEIRA SILVA

PERCLORETO DE FERRO COMO SINALIZADOR DE INJÚRIAS EM
TUBÉRCULOS DE BATATA E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Pectobacterium spp.

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia,
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação
em Agronomia – Doutorado, área de concentração em
Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Rogério Peres Soratto

UNESP-Botucatu

Prof^a. Dra. Angélica Araújo Queiroz

IFTM-Uberlândia

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

UFU

Prof^a. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi
(co-orientadora)

UFU

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, João e Vera Lúcia, pelo sucesso na minha educação e na de meu irmão, diante de todas as adversidades.

Ao meu amado esposo Alexandre, pelo seu amor e paciência a mim dedicado.

Ao meu irmão, Luciano, pelo carinho e participação na minha vida.

A minha afilhada Clarissa, que é uma bênção em nossas vidas.

A toda minha família, que está sempre ao meu lado e que amo muito.

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos anjos protetores, por mais esta conquista;

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida;

Ao professor Dr. José Magno Queiroz Luz, pela orientação, confiança e amizade;

A professora Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi, pelo aprendizado com as fitobactérias e amizade;

Aos meus amigos e estagiários Fernanda e Renato, que muito me ajudaram e que sem eles seria mais difícil esta experiência;

À Associação Brasileira da Batata (ABBA), representada pelo Natalino Shimoyama, pelo apoio, conhecimento e suporte financeiro na realização deste trabalho;

Aos professores que por mim passaram ao longo da pós-graduação, pela enorme contribuição intelectual, em especial à professora Dra. Denise Garcia Santana e o professor Dr; Carlos Machado dos Santos;

Às empresas Grupo Nascente e Agrícola Wehrmann Ltda;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

Aos técnicos do Laboratório de Virologia da UFU;

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Agronomia;

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho, companheirismo e torcida por mim durante toda esta etapa;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e finalização deste trabalho;

A todos o meu MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Botânica da batata.....	3
2.2 Cultivares: Ágata, Atlantic e Asterix.....	7
2.2.1 Batata-semente.....	9
2.3 Bactérias pectolíticas em tubérculos de batata.....	10
2.4 Taxonomia <i>Pectobacterium</i> spp.....	11
2.5 Caracterização fisiológica e bioquímica de <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i> , <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Dickeya chrysanthemi</i> e <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	14
2.6 Caracterização molecular de <i>Pectobacterium</i> spp.....	18
2.7 Atribuições e uso de Percloro de Ferro.....	20
2.8 Transporte e armazenamento de batatas.....	22
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2: Concentração de percloro de ferro e escala de notas para indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. em tubérculos de batata	
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Concentração de percloro de ferro para indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. em tubérculos de batata.....	38
2.2 Determinação da escala de notas para indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. em tubérculos de batata.....	38
2.2.1 Delineamento Experimental.....	39
2.2.2 Análise estatística.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Concentração de percloro de ferro para indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. em tubérculos de batata.....	41
3.2 Determinação da escala de notas para indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. em tubérculos de batata.....	42
4 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 3: Caracterização bioquímica, fisiológica e molecular de isolados de <i>Pectobacterium</i> spp.	
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Origem e manutenção dos isolados.....	50
2.2 Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados	51
2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) dos isolados bacterianos.....	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 Isolamento da bactéria.....	53
3.2 Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados.....	54

3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) dos isolados bacterianos.....	58
4 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	64
CAPITULO 4: Indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. por percloroeto de ferro em tubérculos de batata inoculados	
RESUMO	68
ABSTRACT.....	69
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Instalação e condução do experimento.....	72
2.2 Delineamento experimental.....	73
2.3 Análise conjunta de experimentos.....	73
2.4 Análise estatística.....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1 Indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. por percloroeto de ferro em tubérculos de batata –semente, inoculados do Grupo Nascente.....	75
3.2 Indicação de <i>Pectobacterium</i> spp. por percloroeto de ferro em tubérculos de batata –semente, inoculados do Grupo Agrícola Wehrmann Ltda.....	79
4 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	89
CAPITULO 5: Influência da temperatura no armazenamento e transporte na qualidade de lotes de batata	
RESUMO	93
ABSTRACT.....	94
1 INTRODUÇÃO	95
2 MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1 Instalação e condução do experimento.....	97
2.2 Delineamento experimental.....	99
2.3 Análise estatística.....	99
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
3.1 Indicação de pectobactérias por percloroeto de ferro em lotes comerciais de batata.....	100
4 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS.....	114
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
ANEXOS.....	118

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
1 Tempo de imersão de tubérculos de batata cv. Ágata, em diferentes concentrações de percloroeto de ferro, com 20 minutos de avaliação. Uberlândia-MG, 2009.	41
2 Estimação intervalar para o parâmetro nota em tempos de imersão nas soluções de percloroeto de ferro, avaliadas em dois tempos distintos. Uberlândia – MG, 2009.	42
3 Isolados de <i>Pectobacterium</i> spp. de diferentes locais e hospedeiros.	50
4 Características fenotípicas dos isolados bacterianos, Uberlândia-MG, 2011.	55
5 Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Ágata (Grupo Nascente) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes temperaturas e tempos, Uberlândia-MG, 2010.	76
6 Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Atlantic (Grupo Nascente) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes temperaturas e tempos, Uberlândia-MG, 2010.	77
7 Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Ágata do Grupo Nascente, Uberlândia-MG, 2011.	78
8 Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Atlantic do Grupo Nascente, Uberlândia-MG, 2011.	78
9 Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Ágata (Grupo Agrícola Wehrmann) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes tempos de incubação na temperatura de 35°C, Uberlândia-MG, 2011.	79
10 Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Atlantic (Grupo Agrícola Wehrmann) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes tempos de incubação nas temperaturas de 22°C e 28°C, Uberlândia-MG, 2011.	80
11 Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Atlantic (Grupo Agrícola Wehrmann) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes tempos de incubação na temperatura de 35°C, Uberlândia-MG, 2011.	82
12 Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Ágata (Grupo Agrícola Wehrmann), Uberlândia-MG, 2011.	83
13 Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Atlantic (Grupo Agrícola Wehrmann), Uberlândia-MG, 2011.	83
14 Amostras dos testes realizados de acordo as diferentes cultivares e procedência, coletadas no CEASA, Uberlândia-MG. Uberlândia-MG, 2011.	98
15 Tubérculos de batata cv. Ágata provenientes de São Gotardo-MG e Patrocínio-MG, submetidos a diferentes tempos e temperaturas de incubação, na quantificação do número de batatas podres, Uberlândia-MG, 2011.	105
16 Tubérculos de batata cv. Asterix provenientes de Palmas-PR e cv. Ágata de Araxá-MG, submetidos a diferentes tempos, amostras e temperaturas na quantificação do número de batatas podres, Uberlândia-MG, 2011.	106

- 17 Tubérculos de batata cvs. Aterix e Ágata provenientes de Patrocínio- 107
MG, submetidos a diferentes temperaturas e amostras, na
quantificação do número de batatas podres, Uberlândia-MG, 2011.

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
1	Amplificações de fragmentos de DNA para 10 isolados bacterianos (UFU A6, UFU A7, UFU A9, UFU A14, UFU A20, UFU A22, UFU A27, UFU A33, UFU A37, UFU A47) com a tríade de primers 1491f/L1RA/L1RG, Uberlândia-MG, 2011.	59
2	Amplificações de fragmentos de DNA para o isolado UFU A33, com a tríade de primers Br1f/L1RA/L1RG, Uberlândia-MG, 2011.	61
3	Resultado do teste de sanidade para tubérculos de batata-semente, cultivares Ágata e Atlantic do Grupo Wehrmann Ltda, Uberlândia-MG, 2011.	82
4	Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Araxá-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 12 horas a 28°C, Uberlândia-MG, 2011.	102
5	Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Araxá-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 38°C, Uberlândia-MG, 2011.	102
6	Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Araxá-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 48°C, Uberlândia-MG, 2011.	103
7	Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes do CEASA de Uberlândia-MG, origem desconhecida, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 12 horas a 38°C, Uberlândia-MG, 2011.	103
8	Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes do CEASA de Uberlândia-MG, origem desconhecida, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 38°C, Uberlândia-MG, 2011.	104
9	Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Palmas-PR e Patrocínio-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 12 horas a 48°C, Uberlândia-MG, 2011.	104
10	Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Palmas-PR e Patrocínio-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 48°C, Uberlândia-MG, 2011.	105
11	Tubérculos de batata cv. Ágata com pontos de apodrecimento incubados a 38°C por 12 horas, após 10 minutos de imersão em solução de percloroeto de ferro a 8%, 20 minutos após secagem, Uberlândia-MG, 2011.	109

RESUMO

SILVA, ADELAIDE SIQUEIRA. Percloroeto de ferro como sinalizador de injúrias em tubérculos de batata e caracterização de isolados de *Pectobacterium* spp. 2012. 122 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia¹

O uso de percloroeto de ferro como sinalizador de injúrias em tubérculos de batata poderá ajudar evitando perdas de lotes durante o armazenamento e transporte. Os objetivos do trabalho foram determinar a concentração da solução de percloroeto de ferro e tempo de imersão para a sinalização de bactérias pectolíticas em tubérculos de batata; a qualificação de lotes de batata quanto à presença destas bactérias; a caracterização bioquímica, fisiológica e molecular de isolados de *Pectobacterium* spp. e indicação de pectobactérias por percloroeto de ferro em tubérculos de batata inoculados e lotes comerciais. Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Uberlândia, entre os anos de 2009 e 2011. Para a sinalização de bactérias pectolíticas em tubérculos de batata, foram utilizadas as concentrações 0,0; 8,4; 21,0 e 44,0% de percloroeto de ferro, em que amostras de 10 tubérculos ficaram imersas por 10, 20 e 30 minutos. Em seguida, avaliou-se, aos 10, 20 e 30 minutos e em temperatura ambiente, o surgimento de manchas escuras nos tubérculos. Os isolados foram caracterizados cultural, bioquímica e fisiologicamente pelos testes: Gram, fermentação de glicose, catalase, oxidase, crescimento à 37°C, redução de substâncias a partir de sacarose, atividade da fosfatase, produção de indol e produção de ácido a partir de sorbitol, melibiose, citrato e lactose, reação de hipersensibilidade em fumo e patogenicidade em isca de batata. Para a caracterização molecular, foram utilizados os primers: EXPCCR/EXPCCF; ECA1f/ECA2r, 1491f, L1RA/L1RG Br1f. Para a indicação de pectobactérias pelo produto estudado em tubérculos de batata-semente inoculados, utilizou-se as cvs. Ágata e Atlantic. Os tubérculos foram perfurados e não perfurados com estilete e imersos em água destilada ou na suspensão bacteriana (isolado UFU A14 de *Pectobacterium* spp.) por 5 minutos e incubados em diferentes temperaturas (22°C, 28°C e 35°C) e tempos (0, 24, 48, 72 e 96 horas); em seguida, imersos em solução de percloroeto de ferro com avaliação do diâmetro da lesão formada. O delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas no espaço 5 x 4. Para a indicação de pectobactérias pelo produto em lotes comerciais de batata, foram utilizadas as cultivares Ágata e Asterix. As amostras com seis tubérculos foram avaliadas as 12 e 24 horas após a coleta e incubadas em cinco temperaturas (8°C, 18°C, 28°C, 38°C e 48°C), em seguida, foram imersas por 10 minutos na solução de percloroeto de ferro a 8%, retiradas e deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos para avaliação através de uma escala de notas variando de 0 a 4. Os tubérculos de batatas foram imersos por 10 minutos na solução de percloroeto de ferro 21% e avaliados após 20 minutos no ambiente o que foi suficiente para indicar a presença de fitobactérias. Os isolados não puderam ser caracterizados bioquímica e molecularmente. O teste de inoculação conseguiu comprovar a presença de pectobactérias nos tubérculos pelo percloroeto de ferro. Para os lotes comerciais, as menores temperaturas são mais indicadas para o armazenamento e transporte, e a cv. Ágata foi mais suscetível que Asterix.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*, testes bioquímicos, PCR, transporte.

¹ Comitê Orientador: José Magno Queiroz Luz –UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU (co-orientadora).

ABSTRACT

SILVA, ADELAIDE SIQUEIRA. **Iron Perchlorate as marker of injury in potato tubers and characterization of isolates of *Pectobacterium* spp.** 2012. 123 f. Thesis (Doctorate in Agriculture/Fitotecnia)-Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia¹

The use of iron perchlorate as a marker of injury in potato tubers may help prevent loss of lots during storage and transport. The objectives of this study were to determine the concentration of iron perchlorate solution and the immersion time for the marking of pectolytic bacteria in potato tubers; the evaluation of potato batches for the presence of these bacteria; the biochemical, physiological and molecular characterization of *Pectobacterium* spp. isolates; and the indication of pectobacteria by iron perchlorate in inoculated and commercial batches of potato tubers. The experiments were done at the Universidade Federal de Uberlândia, from 2009 to 2011. Marking of pectolytic bacteria in potato tubers was done using iron perchlorate concentrations of 0, 8, 21 and 44%, in which a sample of 10 tubers were immersed for 10, 20 or 30 minutes, and evaluated after 10, 20 and 30 minutes at room temperature, evaluating the appearance dark spots on the tubers. The isolates were characterized culturally, biochemically and physiologically by the tests of: Gram, glucose fermentation, catalase, oxidase, growth at 37°C, reduction of substances from sucrose, phosphatase activity, indol production and acid production from sorbitol, melibiose, citrate or lactose, hypersensitivity reaction in tobacco and pathogenicity in potato baits. Molecular characterization was done using the primers: EXPCCR/EXPCCF; ECA1f/ECA2r, 1491f, L1RA/L1RG Br1f. The indication of pectobacteria by the product studied in inoculated seed potato tubers was done with the cultivars Ágata and Atlantic. The tubers were perforated, or not, with a needle and immersed in distilled water or in bacterial suspension (isolate UFU A14 of *Pectobacterium* spp.) for 5 minutes and incubated at different temperatures (22, 28 or 35°C) and times (0, 24, 48, 72 or 96 hours), and subsequently immersed in the de perchlorate solution for the evaluation of lesion diameter. The experimental design was randomized blocks with four repetitions, as split plots in space 5 x 4. The indication of pectobacteria by the product in commercial potato batches was done with cultivars Ágata and Asterix. The samples with six tubers were evaluated 12 and 24 hours after harvest and incubated in five temperatures (8, 18, 28, 38 or 48°C), and immersed in 8% iron perchlorate solution for 10 minutes, removed and left at room temperature for 20 minutes before evaluation with a rating scale, varying from 0 to 4. Immersion for 10 minutes in iron perchlorate at 21% and evaluation after 20 minutes at room temperature was adequate to indicate the presence of pectobacteria. The isolates could not be characterized biochemistry and molecular. The inoculation test was able to confirm the presence of pectobacteria in the tubers by perchlorate. Storage and transport of commercial potatoes should be done at lower temperatures; the cultivar Ágata was more susceptible than Asterix to the pectobacteria.

Keywords: *Solanum tuberosum*, biochemical tests, rating scale, transport.

¹ Supervising committee: José Magno Queiroz Luz –UFU (Supervisor) and Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU (co-supervisor).

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da batata *Solanum tuberosum* L. é a principal hortaliça no Brasil, apresentando um papel importante na economia do país devido à produção, comercialização, consumo e exigência de um produto de boa qualidade.

A batata, *Solanum tuberosum* L., é originária dos Andes peruanos e bolivianos onde é cultivada há mais de 7.000 anos. Foi introduzida na Europa por volta de 1570 pelos colonizadores espanhóis e por volta de 1620 foi levada da Europa para a América do Norte, tornando-se importante fonte de alimento. Historicamente e até os dias de hoje, é a base alimentar de vários países, principalmente os de clima temperado. É mundialmente caracterizada como um alimento popular, sendo a quarta fonte de alimento mundial, ficando atrás somente do trigo, arroz e o milho.

No Brasil, teve seu cultivo no início do século XX, e atualmente estima-se uma produção de 3.459.180 toneladas, com cerca de 139.810 hectares de área colhida (AGRIANUAL, 2011). O estado de Minas Gerais participa com 33,5% do volume de produção, seguido apenas pelo Paraná (27,9%), Rio Grande do Sul (19,0%) e São Paulo (14,8%) (IBGE, 2011).

Hoje, no Brasil, um dos grandes problemas enfrentado pela batata consumo são as perdas na pós-colheita, ocasionadas principalmente por condicionamentos inadequados, durante o armazenamento e o transporte, devido a presença de bactérias.

No processo de estocagem de tubérculos de batata, podem ocorrer perdas significativas de até 100%, sendo atribuídas à podridões causadas por bactérias pectolíticas, mais especificamente *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca) (VAN HALL, 1902) Hauben et al., 1998, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (Jones, 1901) Hauben et al., 1998 e *Dickeya chrysanthemi* (BULKHOLDER et al., 1953) Hauben et al., 1998 (BENELLI, 2004).

O percloroeto de ferro é um sal de fórmula química $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, cuja forma hexahidratada é muito utilizada na corrosão de placas para a preparação de circuitos impressos usados em eletrônica. É também usado como floculante para tratamento de água e esgoto; suas soluções de água são ácidas e corrosivas para a maioria dos metais, e apresenta coloração marrom “café”. Seus efeitos, quando em solução aquosa, são

semelhantes aos produzidos pelo perclorato, que é considerado um contaminante de solos em potencial, encontrado no ambiente introduzido por meio de seus compostos em grandes quantidades na forma de desinfetantes, agentes clareadores e herbicidas, que não são formados naturalmente no ambiente, causando sérios problemas de saúde como o acúmulo de iodo nas glândulas da tireóide. Na tentativa de reduzir seus efeitos, há estudos onde bactérias redutoras do perclorato presentes no solo podem agir como biorremediadores, diminuindo sua ação no meio (COATES et al., 1999).

O percloroeto de ferro tem sido utilizado na França como meio de indicar a presença ou não de danos mecânicos em lotes de batatas, a fim de determinar seu destino. Com esta indicação, é possível armazenar lotes de batata, no período do inverno, em condições adequadas, disponibilizando-as ao mercado consumidor à medida que preciso, evitando que haja perdas significativas por contaminação de microorganismos durante o período que ficam armazenados (informação verbal)¹.

Assim, os objetivos deste trabalho foram determinar a concentração da solução de percloroeto de ferro e tempo de imersão para a sinalização de bactérias pectolíticas em tubérculos de batata; a qualificação de lotes de batata quanto a presença de bactérias pectolíticas, aplicando uma escala de notas; a caracterização bioquímica, fisiológica e molecular de isolados de *Pectobacterium* spp. e indicação de pectobactérias por percloroeto de ferro em tubérculos de batata inoculados e lotes comerciais.

¹ Informação fornecida pela Associação Brasileira da Batata (ABBA) em 2009.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Botânica da batata

A batata é uma planta dicotiledônea, pertencente ao gênero *Solanum*, da família *Solanaceae*, a qual contém mais de 2.000 espécies, embora somente cerca de 150 produzam tubérculos. A batata cultivada no Brasil pertence à espécie tetraplóide *Solanum tuberosum*. Esta espécie é dividida em duas subespécies, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* e *S. tuberosum* subsp. *andigena* (BORGES et al., 2008).

A batata é uma planta perene, embora cultivada como planta anual, sua parte aérea é herbácea, com altura variável entre 50 e 70 cm.

O ciclo vegetativo da cultura pode ser precoce (<90 dias), médio (90-110 dias) ou longo (>110 dias), dependendo da cultivar.

O número de hastes por planta pode variar, dependendo da brotação e da idade fisiológica do tubérculo-semente, da região produtora e das condições climáticas de cultivo (FORTES; PEREIRA, 2003). Segundo Lopes (1997), uma planta normal de batata é composta de tantas hastes quanto forem os brotos que emergirem da batata-semente, folhas compostas, flores, raízes, estolões e tubérculos.

O caule compreende duas partes distintas: uma aérea e outra subterrânea. O caule aéreo da batata é normalmente oco na sua parte superior, tem secção circular, quadrangular ou triangular, podendo apresentar asas, que são lisas ou onduladas. A coloração predominante é verde, podendo ser arroxeadas ou pigmentadas. Quando o caule cresce diretamente do tubérculo-mãe ou próximo dele, é chamado de "rama", que pode ou não se ramificar.

Segundo Fortes e Pereira (2003), a planta de batata, por ser bastante ramificada, pode ser classificada como ereta, aberta ou decumbente, em função da disposição dos ramos em relação ao caule. Uma planta é decumbente quando os ramos encontram-se prostrados junto ao solo; ereta quando os ramos estão mais ou menos próximos ao caule e aberta quando os ramos estão mais afastados do caule.

Na superfície dos tubérculos, as estruturas mais evidentes são os olhos, cada um contendo mais de uma gema, e as lenticelas, eles podem variar de acordo com a cultivar, tamanho do tubérculo e condições de cultivo. Cada olho possui uma gema principal que também produz brotações laterais ou estolões (LOPES, 2002).

Quando o tubérculo é cortado longitudinalmente, pode-se observar a periderme (pele), o córtex, o anel vascular, a medula externa e a medula interna, esta mais clara, que se comunica com os olhos. A pele ou película da batata, formada de 5 a 15 camadas de células, é praticamente impermeável a líquidos e gases, protegendo o tecido contra o ataque de pragas e doenças. Quando a colheita é precoce e o tubérculo ainda não está maduro, a pele se solta com facilidade, favorecendo a deterioração do tubérculo pela entrada de patógeno e perda de umidade (BORGES et al., 2008).

A comunicação entre a parte interna do tubérculo e o exterior dá-se pelas lenticelas, que são pequenos sistemas de comunicação e estruturas importantes para a respiração. Segundo Lopes (2002), os tubérculos produzidos em solos muito úmidos apresentam a lenticelose, que consiste em lenticelas abertas e de tamanho aumentado, provocada por uma reação dos tecidos para compensar a baixa disponibilidade de oxigênio. A lenticelose favorece a entrada de microrganismos fitopatogênicos nos tubérculos.

Outra forma de favorecer a penetração de fitopatógenos é através de pequenos ferimentos na superfície dos tubérculos. Quando isto ocorre, inicia-se logo um processo de formação de uma camada corticosa denominada de suberização que protege o tecido contra a desidratação, sendo este processo chamado de "cura". Em temperaturas mais elevadas, acima de 25°C, e alta umidade relativa, próxima dos 90% com alto suprimento de oxigênio, a suberização é mais rápida; em contrapartida, estes fatores também contribuem para a manifestação de fitopatógenos. Dessa forma para que seja evitada a contaminação dos tubérculos, em especial os de batata-semente, é preciso que a cura durante o armazenamento destas ocorra em temperatura abaixo de 15°C com baixa umidade, ficando abaixo de 90% (LOPES, 2002).

O tubérculo passa por um período de dormência compreendido entre a colheita e o início de brotação. O período de dormência do tubérculo depende da cultivar, da maturidade do tubérculo na colheita, das condições climáticas durante o ciclo cultural da planta, das injúrias no tubérculo e do ambiente de armazenamento. Qualquer fator que acelere a maturação reduz o período necessário à brotação. Quando a dormência termina, a temperatura de armazenamento determina a taxa de crescimento dos brotos.

Tubérculos colocados em condições ambientais favoráveis à brotação tendem a desenvolver somente o broto apical, que se torna dominante sobre os demais, somente após um certo período a dominância apical é quebrada. Ao iniciar a brotação, o tubérculo passa por três estádios fenológicos. O primeiro é conhecido como tubérculo

fisiologicamente jovem, fase de dominância apical. O segundo, chamado estágio normal, quando há crescimento de diversos brotos até a ramificação dos mais velhos. Finalmente, o estágio fenológico velho, quando há aparecimento de pequenos tubérculos na base dos brotos (FINGER; FONTES, 1999).

As folhas são compostas, sendo formadas por um pecíolo com folíolo terminal, por folíolos laterais e, às vezes, por folíolos secundários e terciários. Dependendo da cultivar, as folhas têm tamanho, pilosidade e tonalidade de verde diferentes (LOPES, 2002).

As flores da batateira apresentam a corola gamopétala com cinco pétalas, em cor que varia de branca à azulada. São distribuídas em inflorescência do tipo cimeira. O androceu e o gineceu amadurecem ao mesmo tempo, facilitando a autofecundação, que ocorre na maioria cultivares. Os frutos são biloculares do tipo baga, de cor verde, normalmente medindo de 2 a 3 cm de diâmetro, contendo de 40 a 240 sementes por fruto (LOPES, 2002).

O sistema radicular da planta é relativamente superficial, com a quase totalidade das raízes permanecendo a uma profundidade não superior a 40 - 50 cm. Entretanto, em solos argilosos férteis e sem camadas de obstrução, podem alcançar até 1,0 m de profundidade. Quando o plantio é feito com batata-semente, as plantas desenvolvem raízes adventícias nos nós do caule subterrâneo, facilmente visíveis nas brotações dos tubérculos. Quando a semente verdadeira (semente-botânica) é plantada, forma-se uma raiz pivotante com raízes laterais (BORGES et al., 2008).

Filgueira (2003), em observações em solos sob cerrado com as cultivares Bintje (ciclo precoce), e Aracy (ciclo tardio) descreveram quatro estádios de desenvolvimento da batateira observados no campo, estádios I, II, III e IV.

Estádio I - é o mais curto: do plantio da batata-semente brotada até a emergência das hastes, o que ocorre de uma a duas semanas, dependendo da cultivar. A planta utiliza a reserva de nutrientes solúveis no sulco de plantio, inclusive, pode ter efeito deletério. A exigência de água é mínima e o excesso prejudicial à cultura em início.

Estádio II – compreende o intervalo entre a emergência e o início da tuberização, que se inicia na quarta (precoce) ou na quinta semana (tardia) após o plantio. Ao final desse estágio, efetua-se a adubação complementar, em cobertura, seguida pela amontoa. O desenvolvimento vegetativo se acelera e principia a acumulação de fotossintatos nos tubérculos. À medida que o sistema radicular se

desenvolve, a planta passa a utilizar os nutrientes do solo. Também aumenta a exigência de água da cultura.

Estádio III – prolonga-se do início da tuberização até a planta atingir o máximo desenvolvimento vegetativo. Esse “pico de vegetação” ocorre na oitava (precoce) ou na décima semana (tardia) após o plantio. Esse estágio caracteriza-se pelo desenvolvimento acelerado da parte aérea e pela acumulação de fotossintatos nos tubérculos, alcançando a superfície fotossintetizante o máximo em extensão e eficiência. Pode ocorrer ou não o florescimento, dependendo das condições agroclimáticas, sem interferência na produção de tubérculos. Nesse estágio, é máxima a absorção de nutrientes que devem-se encontrar em forma assimilável pelo sistema radicular. Também é máxima a exigência de água. Os problemas fitossanitários iniciam-se, podendo exigir a pulverização com defensivos.

Estádio IV – é o mais longo: “do pico de vegetação” até a senescência natural da planta. Nesta fase, verifica-se substancial incremento em peso nos tubérculos, enquanto a parte aérea se mantiver ativa, que pode atingir um ganho diário de até uma tonelada por hectare. O amarelecimento inicia-se na décima segunda (precoce) ou na décima quarta semana (tardia) após o plantio e termina com a planta seca e os tubérculos maduros. A exigência de água ainda é elevada, mas vai diminuindo à medida que a senescência se aproxima. Agravam-se os problemas fitossanitários, exigindo a pulverização com defensivos.

O ciclo completo – do plantio da batata-semente brotada até a secagem da planta – varia de 14 a 16 semanas dependendo da cultivar, bem como de outros fatores.

Diversos fatores determinam a duração do ciclo da batateira, tais como, temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa, densidade de plantio, cultivar, nitrogênio, entre outros que interagem e, dessa forma, influenciam na tuberização (FONTES, 2005).

2.2 Cultivares: Ágata, Atlantic e Asterix

Entre as cultivares mais plantadas no Brasil destacam-se a Ágata, Atlantic, Asterix, Markies e Mondial, representando a maior parcela de toda área plantada de batata no país (FERNANDES et al., 2010). Segundo Borges e colaboradores (2008), a cultivar Ágata representa mais de 60% da área plantada e conseqüentemente mais de 70% da produção nacional, chegando a produzir mais de 50 toneladas por hectare, devido a melhor relação custo/benefício da cultivar.

Até que outra variedade possa superá-la quanto às exigências do mercado, o qual valoriza apenas o aspecto externo dos tubérculos exigindo bom formato e pele lisa e brilhante, ela manterá essa importância no cenário agrícola.

A cultivar Ágata é originária da Holanda, suas plantas possuem hastes finas e moderadamente finas, que se espalham de cor verde muito pronunciada; folhas moderadamente grandes, de silhueta bastante fechada e de cor verde bastante clara; folículos grandes a muito grandes e largos com nervuras superficiais; floração pobre de inflorescências pequenas e flores brancas. Seus tubérculos são ovais, apresentam casca amarela e predominantemente lisa, polpa de cor amarelo-claro e olhos superficiais. Apresentam broto cilíndrico, largo, de cor violeta avermelhado pouco pronunciado e escassamente piloso; botão final semi-grande e de cor vermelha pouco pronunciada, ramificações semi-longas a longas, com brotação precoce. Com relação às doenças, é considerada suscetível à *Phytophthora* das folhas; muito pouco suscetível ao Potato vírus Y (PVY); imune ao *Synchytrium endobioticum* (verrugose da batata), bastante suscetível à *Streptomyces scabies* (sarna comum); bem como às podridões, quando exploradas sob condições de alta precipitação pluviométrica ou em condições ambientais favoráveis a estes patógenos.

Devido às suas características organolépticas, é destinada ao consumo fresco, bastante consistente e de cor firme quando cozida, considerada imprópria para fritura (BORGES et al., 2008).

A Atlantic tem sido utilizada em grande escala na indústria de processamento para chips (FERNANDES et al., 2010). Tem origem nos EUA, como batata-semente produzida e comercializada pelo Canadá. Possui plantas vigorosas, com hastes grossas, eretas, ciclo médio de 95 dias e flores de coloração rosa, suas folhas são grandes e verde-claras. Seus tubérculos apresentam formato oval-arredondado, película amarela ligeiramente rendilhada, olhos medianamente profundos, polpa branca. É suscetível ao

coração-oco (falha no interior do tubérculo formando uma cavidade, causada por um crescimento muito rápido, devido ao desbalanço hídrico ou deficiência de potássio), quando plantada em espaçamentos largos, à *Phytophthora infestans* (requeima), ao Potato vírus Y (PVY) e à *Ralstonia solanacearum* (murchadeira), sendo pouco susceptível à *Streptomyces scabies* (sarna comum). É moderadamente resistente à requeima e muito resistente ao vírus X. Resistência baixa ou intermediária às demais doenças de maior importância no país, como as podridões. É indicada para indústria de processamento como palitos fritos, porém produz palitos curtos por ter tubérculos arredondados. Especialmente indicada para produção de “chips, por apresentar alto teor de matéria seca e pelo formato do tubérculo. É uma cultivar de rendimento elevado, mesmo com adubações médias, apresentando grande adaptação e estabilidade de produção nas diferentes regiões produtoras, quase sempre com alta porcentagem de tubérculos graúdos. (BORGES et al., 2008).

A cultivar Asterix, também originada da Holanda, é considerada uma variedade semi-tardia, apresentam rápida emergência, um número médio de hastes e uma folhagem bem desenvolvida. Caracteristicamente, seus tubérculos são grandes com formato oval-alongado, olhos bastante superficiais e película vermelha, ficando rosada durante o plantio em épocas quentes, possuem polpa amarela e apresentam alto rendimento e teor de matéria seca.

Para Borges e outros (2008), a cultivar Asterix é considerada moderadamente resistente ao vírus do enrolamento da folha da batata (PLfIV), transmitido por várias espécies de pulgões, destacando-se o *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* (SALLES, 2012) e à *Streptomyces scabies* (sarna comum); apresenta boa resistência ao Potato vírus X (PVX); é suscetível aos Potato vírus A (PVA) e Potato vírus Y (PVY) e à *Phytophthora* das folhas, com boa resistência à *Phytophthora* dos tubérculos, à *Alternaria solani* (alternaria), ao *Fusarium solani* (fusarium) e ao nematóides de cisto (*Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis*), comumente chamados nematóides dourado da batata, e imune ao *Synchytrium endobioticum* (verrugose da batata –cancro). Também é bastante resistente ao enegrecimento interno e a danos mecânicos.

Segundo Benelli e colaboradores (2004), a cultivar Asterix mostrou ser menos suscetível à podridão mole; diferenciando significativamente das cultivares Achat, Monalisa e Baronesa, demonstrando sua resistência frente à podridão incitada por pectobactérias.

Devido seu alto teor de matéria seca, apresenta características muito boas tanto para o cozimento, quanto para fritas, sendo bastante utilizada industrialmente na fabricação de French Fries (Pré-fritas congeladas), em função do seu formato oval alongado propiciar um ótimo aproveitamento no corte em palitos. Para que se tenha uma boa produção, é recomendada uma irrigação regular no período e 45 e 60 dias depois do plantio, sendo então aconselhável que se faça irrigação em períodos de seca, evitando perdas na produtividade. Uma melhor produtividade nas safras de inverno, com irrigação adequada, foi observada no Brasil (BORGES et al., 2008).

No estudo da qualidade nutricional e esverdeamento pós-colheita de batatas, Evangelista e colaboradores (2011) confirmaram o fato de que as cultivares Ágata apresentam tubérculos com características adequadas para o mercado fresco, na preparação de massas e uso culinário, apresentando também menor qualidade nutricional e protéica, já a Atlantic indicada para fritura, enquanto Asterix para o preparo de massas e fritura.

2.2.1 Batata-semente

A batata é uma hortaliça de propagação vegetativa e, nesse processo de propagação, o material está sujeito a infecções por patógenos como fungos, bactérias e, principalmente, vírus, os quais a cada ciclo vegetativo são transmitidos para a próxima geração, contribuindo para o processo de degenerescência da cultura. Assim, é de grande importância a utilização de sementes de alta qualidade genética e fitossanitária para compor a lavoura. Há duas formas de obter material propagativo livre de viroses: pelo cultivo das sementes verdadeiras ou botânicas, visto que as viroses, em sua maioria, não são transmitidas pelas sementes; e pela cultura de meristemas (FORTES; PEREIRA, 2003).

A cultura de meristemas é uma técnica mais comumente utilizada para obtenção e recuperação de plantas livres de vírus, na qual baseia-se na premissa de que a distribuição do patógeno não é uniforme na planta infectada e, portanto, o uso destes tecidos forneceria material livre de patógenos para ser multiplicado sob condições artificiais e controladas (FORTES; PEREIRA, 2003).

A batata-semente no Brasil é regida pelas Normas Gerais de Certificação de Batatas-Semente (BRASIL, 1987), tendo, dentre outros objetivos principais, a preservação da identidade genética, a produção de material com baixo nível de infecção

e infestação de vírus, bactérias, nematóides e outros agentes patogênicos capazes de reduzir, nas condições brasileiras, seu potencial de produção e/ou remultiplicação.

Assim, o cultivo *in vitro* é essencial para a obtenção de plantas saudáveis livres de vírus. A planta obtida *in vitro* deve ser multiplicada em condições adequadas, que previnam reinfecções por patógenos de solo e por aqueles que são transmitidos pelos vetores aéreos (PEREIRA; DANIELS, 2003).

Para Hirano (2003), a batata-semente caracteriza-se como um dos itens que mais oneram o custo de produção da bataticultura, além de ser um insumo limitante na sua produtividade e qualidade. Na prática, pode-se plantar qualquer tipo de tubérculo de batata, mas somente com batata-semente de qualidade são obtidas alta produtividade e qualidade de batata-consumo. Sendo a alta qualidade influenciada pelo custo de produção, divididos entre fertilizantes, batata-semente, defensivos e custo operacional.

O nível de tolerância de patógenos em batata-semente é determinado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Anexo A1) para produção, importação e comercialização de batata semente, para pragas não-quarentenárias regulamentadas (PNQR), danos e misturas, de acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 10 DE JUNHO DE 2005. Onde o grau de incidência de cada uma das pragas não-quarentenárias regulamentadas danos e misturas, deve ser calculado pelo número de tubérculos atacados em relação aos tubérculos componentes da amostra representativa do lote ou partida.

As inspeções no campo, na colheita e no armazém, proporcionam a boa sanidade da batata-semente, garantindo níveis toleráveis de doenças. Estas características de sanidade nos tubérculos são encontradas em batata-semente das classes básica, registrada ou certificada, produzidas por produtores especializados e cadastrados nas Secretarias de Agricultura dos Estados (FURUMOTO; LOPES, 1997).

2.3 Bactérias pectolíticas em tubérculos de batata

O número de doenças bacterianas em hortaliças é grande, muitas vezes limitantes para o desenvolvimento da cultura. Como exemplo, tem-se as bactérias do gênero *Pectobacterium*, responsáveis pelos quadros de podridão mole em tubérculos de batata (BERIAM, 2007).

Para a cultura da batata, há a descrição de quatro grupos de pectobactérias economicamente importantes causadores de doenças: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca) (GARDAN et al., 2003), *Dickeya chrysanthemi* (Dc) (PÉROMBELON; KELMAN, 1987; PEROMBELON, 2002; THOT et al., 2003; SAMSON et al., 2005) e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (DUARTE et al., 2004).

Para Elphinstone (1987), as pectobactérias são caracterizadas pela produção de enzimas extracelulares em grande quantidade, causando a degradação de substâncias pecticas presentes nos tecidos parenquimatosos, levando ao encharcamento, devido à destruição da lamela média que une as células, ocasionando assim, a perda de água, resultando na não emergência da planta. A estes sintomas é chamado de podridão mole.

Os sintomas desta doença variam de acordo com as condições do ambiente, resistência ou suscetibilidade do cultivar e parte da planta afetada. Além disso, a concentração de oxigênio e a umidade são fatores importantes na intensidade da doença. A presença de oxigênio auxilia no desenvolvimento de infecções latentes (DE BOER et al., 1987). Devido à ausência de especificidade na interação patógeno-hospedeiro, essas bactérias podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, sendo que uma mesma planta pode ser infectada por várias espécies ou subespécies deste grupo de bactérias.

A podridão mole dos tubérculos pode ser iniciada nas lenticelas quando em contato com ferimentos contaminados e em locais úmidos (CZAJKOWSK et al., 2011). A lesão pode se espalhar por todo o tubérculo e passar para os demais sob armazenamento. O tecido do tubérculo é macerado formando uma pasta cremosa consistente de tecido que, na presença do ar, escurece, desenvolvendo mau cheiro após invasão por patógenos secundários. Em câmaras frias ventiladas inadequadamente, a podridão propaga adjacientemente aos outros tubérculos como um líquido que se espalha aos demais, apodrecendo todo um lote armazenado.

2.4 Taxonomia *Pectobacterium* spp.

As Pectobactérias são pertencentes do Domínio Bactéria; Reino Proteobactéria, Subdivisão Gamma; Família Enterobacteriaceae e Gênero *Pectobacterium* (YOUNG et al., 1992).

As bactérias do gênero *Erwinia* capazes de produzir enzimas pectolíticas passaram por um processo de reclassificação sendo denominadas de *Pectobacterium*

carotovorum subsp. *carotovorum* (*E. carotovora* subsp. *carotovora*), *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (*E. carotovora* subsp. *atroseptica*), *Dickeya chrysanthemi* (*P. chrysanthemi*, *E. chrysanthemi*) (HAUBEN et al., 1998, SAMSON et al. 2005) e a proposta de uma nova subespécie *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (DUARTE et al., 2004).

Mais de 60 espécies têm sido nomeadas e muitas outras sugeridas como sinônimos de espécies de *Erwinia* desde 1917, quando foi publicado pela primeira vez o nome genérico *Erwinia* por Winslow. Em 1945, Waldee concluiu que *Erwinia* deveria restringir-se a *E. amylovora* a espécies patogênicas causadoras de necrose, e propondo o gênero *Pectobacterium* para *E. carotovora* a espécies causadoras de doenças envolvendo podridão mole. Nesta época, a proposta deste gênero não teve aceitação geral, pois sua característica pectolítica não foi considerada suficiente para formar um grupo natural baseado em considerações fenotípicas mais gerais (DUARTE, 1999).

A ocorrência destas pectobactérias restringem-se a regiões de clima temperado para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; com ampla distribuição nas zonas temperada e tropical, podendo sobreviver em diversos ambientes, incluindo solos, rios e lagos a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, e encontra-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais e em zonas mais quentes das regiões temperadas a *Dickeya chrysanthemi*. (BENELLI, 2004). Segundo Oliveira (2001), suas temperaturas ótimas de desenvolvimento são: 15 a 20°C, 27 a 30°C e 34 a 37°C para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Dickeya chrysanthemi*, respectivamente.

Considerando análises de seqüências de rDNA 16S, Hauben et al. (1998) propuseram várias mudanças nos gêneros de *Erwinia* e *Pectobacterium*. Estas propostas foram validadas na Lista de Validação nº 68, como: restringir o gênero *Erwinia* a espécies do grupo I; transferir as espécies do grupo III para o novo gênero *Brenneria*; e unificar as espécies do grupo II, renomeando-as da seguinte forma: *Erwinia carotovora* (DYE, 1969) para *Pectobacterium carotovorum*; *Erwinia chrysanthemi* (BURKHOLDER, 1953) para *Pectobacterium chrysanthemi*; *Erwinia cypripedii* para *Pectobacterium cypripedii* e *Erwinia cacticida* para *Pectobacterium cacticidum*, sendo essas as responsáveis por causarem uma rápida maceração dos tecidos de plantas. Não há registro de ocorrência no Brasil das duas últimas, com ambas possuindo distribuição e hospedeiros restritos (TAKATSU, 1983). Com ampla distribuição em diferentes

regiões tropicais e temperadas, temos a *Pectobacterium carotovorum* e *Dickeya chrysanthemi* infectando várias espécies vegetais (DICKY, 1979; LUMB, et al., 1986).

A *D. chrysanthemi* foi considerada uma espécie com grande variabilidade nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas, preferências de hospedeiras e outras, julgada como um grande complexo, com vários critérios ou tentativas de agrupamento das diferentes estirpes que a compunham (TAKATSU, 2007).

Devido a grande heterogeneidade do grupo, Samson e outros (2005) propuseram a reclassificação *D. chrysanthemi* em função da análise filogenética baseada na sequência de genes da região 16S do rRNA e análise comparativa das hibridações DNA-DNA para *Dickeya chrysanthemi*. Formando assim um grupo sólido e que diferia das outras “erwinias pectolíticas”.

As análises de genes de rRNA de 16S permitem aos membros do gênero *Dickeya* formarem uma chave determinada e a proporção de G-C do gênero varia de 56,4 a 59,5 em mol % (SAMSON et al., 2005).

O gênero *Dickeya* compreende, além das espécies novas, as estirpes que não se enquadram em nenhuma das novas espécies descritas ou provenientes de relatos de novas hospedeiras, as quais não puderam ser ainda identificadas ao nível de espécies (TAKATSU, 2007).

Uma nova subespécie apresentada como uma variante de *P. carotovorum* foi proposta, associada à canela preta e à podridão mole da batata, denominada de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (DUARTE et al., 2003). Embora rejeitada quando apresentada, esta proposta possui hoje níveis de aceitação, onde foi detectada na África do Sul, causando canela preta e podridão mole em batatas (VAN DER MERWE et al., 2010). Esta última subespécie foi proposta conforme estudos que mostraram que estirpes brasileiras, isoladas de lavouras do Rio Grande do Sul, inicialmente identificadas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (OLIVEIRA et al., 2003), apresentaram perfis genéticos, bioquímicos, fisiológicos e sorológicos diferentes dos esperados para essa subespécie (DUARTE et al., 2004). Suas características, como formação de ácido a partir de α - metil glucosídeo e de substâncias redutoras de sacarose que são também de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, mas que diferentemente destas crescem a 37°C, foram inicialmente incluídas no grupo dos isolados de formas intermediárias e não identificadas, que posteriormente vieram a ser identificadas como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (EL TASSA; DUARTE, 2004), provavelmente pela

falta de ferramentas de detecção e escassez de informações relacionadas ao clima tropical (DUARTE et al., 2004; DUARTE; EL TASSA, 2003).

O avanço no estudo taxonômico de bactérias dá-se a junção da técnica da PCR ao sequenciamento, uma vez que os genes 16S e 23S do rRNA são amplamente utilizados como cronômetros moleculares, inferindo na filogenia microbiana no estudo de diversas bactérias fitopatogênicas, resultando em grande impacto na taxonomia (GUTELL et al., 1994). Baseado em comparações dos genes conservados como o 16S, é possível observar pequenas alterações e detectar regiões do gene supostamente alteradas durante a evolução, enquanto isso os genes de rDNA são utilizados como alvos para detecção e discriminação entre espécies e gêneros (LOUWS et al., 1999), baseado em resultados encontrados na análise da região 16S rDNA que o gênero *Pectobacterium* foi proposto (HAUBEN et al., 1998).

O estudo das bactérias pertencentes ao gênero *Pectobacterium* spp. e *Dickeya chrysanthemi* são de suma importância na produção de batata-semente, uma vez que são consideradas os grandes agentes causais da canela preta e podridão mole dos tubérculos de batata (CZAJKOWSKI, 2011).

2.5 Caracterização fisiológica e bioquímica de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi* e *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*

De acordo com Seo e colaboradores (2004), a identificação de isolados de *Pectobacterium* é baseada principalmente no estudo de características bioquímicas e fenotípicas. Para Duarte e outros (2003), essa identificação em nível de espécies e subespécies de pectobactérias por meio dos testes bioquímicos e fisiológicos é baseada num padrão de reação bacteriana a um número relativamente pequeno de testes diferenciais. As pectobactérias podem ser confirmadas como representantes do gênero *Pectobacterium* em poucos testes: teste oxidação/fermentação positivo (anaeróbias facultativas), catalase positiva, oxidase negativa e podridão mole em batata positiva (PERÓMBELON; VAN DER WOLF, 1998). No entanto, há uma considerável variação fenotípica relatada dentro de uma espécie, denotando que um isolado pode diferir em poucas características da descrição padrão de uma espécie, podendo ser um membro desta, gerando dificuldades e impossibilitando a identificação correta destas bactérias (JABUONSKI et al., 1986; STANGHELLINI; MENELEY, 1975).

Segundo Takatsu (2007), as colônias de bactérias pectolíticas possuem as mesmas características básicas, embora variáveis; apresentando um crescimento relativamente rápido, tornando-se visível sobre o meio de cultura em um dia de incubação a 25 a 30°C, são formadas no período de dois dias, possuem colônias circulares ou amebóides de bordos irregulares de 2 a 3 mm de diâmetro, opacas, de coloração bege-creme clara. As colônias possuem como característica a formação de uma protuberância no centro, formando o aspecto de um ovo frito, podendo ser melhor visualizado na lupa (TAKATSU, 2007).

As *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* são um grupo em que há uma grande diversidade, possibilitando a existência de espécies e subespécies dentro deste grupo tão heterogêneo. Elas podem ser divididas em mais de 50 sorogrupos, possuem ampla distribuição geográfica, presentes em zonas de clima temperado e tropical e ainda são patógenos de diversas culturas (DUARTE, 2003 apud ALIPPI et al., 1996; MASVELT; CARSTENS, 1999; PÉROMBELON, KELMAN, 1980; SMITH, BARTZ, 1990).

A *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* diferencia-se por não crescer à 37°C e produzir ácido e substâncias redutoras a partir de alfa-metil glucosídeo e sacarose, respectivamente. Suas estirpes associadas à canela preta são restritas à batata, cultura de clima frio, ainda que algumas estirpes muito semelhantes possam ser ocasionalmente encontradas em outras culturas. A maioria das estirpes pertence ao sorogrupo I, mesmo formando um grupo sorológico heterogêneo; e ainda, são mais sensíveis à altas temperaturas do que *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Dickeya chrysanthemi* (BRADBURY, 1986; PÉROMBELON, KELMAN, 1980; DE BOER et al., 1987; DE BOER, 2002).

Estudos com estirpes brasileiras identificadas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* apresentaram perfil genético, bioquímico, fisiológico e sorológico diferente, gerando a proposta de uma nova subespécie: a *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Com testes bioquímicos, conseguiu-se separar isolados de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* e *Dickeya chrysanthemi*, no entanto, as diferenças entre *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* e *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* não ficaram evidentes com estes testes apenas. Estes resultados também mostram o fato da constante presença de estirpes com características diferentes do resto

do grupo; denotando ser incontestável que tais estirpes não se tratam de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (DUARTE et al., 2003).

Em um levantamento de pectobactérias em diferentes hospedeiros e regiões do Brasil, foi observado um grande número de estirpes formando ácido a partir de α -metil glicosídeo e de substâncias redutoras a partir de sacarose, características de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, mas crescendo a 37 °C, com isso estes isolados foram incluídos no grupo dos intermediários e não identificados (JABUONSKI et al., 1986). Isto demonstra que, apesar do grande número de dados publicados sobre pectobactérias, referências sobre a ocorrência de formas intermediárias, nas condições brasileiras, ainda são muito escassas. De acordo Duarte e colaboradores (2004), as identificações anteriormente realizadas não levaram em conta a grande homogeneidade genética, bioquímica e fisiológica destas estirpes, que culminou na proposição de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. No Rio Grande do Sul, a coleta de plantas com sintomas de canela preta resultou na obtenção de 408 isolados. Dentre estes, 55, 42 e 1% foram identificados com base em características bioquímicas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *D. chrysanthemi*, respectivamente, e 2% apresentaram características que não corresponderam ao padrão bioquímico e fisiológico de nenhuma espécie ou subespécie. No entanto, oligonucleotídeos iniciadores específicos para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (DE BOER; WARD, 1995; FRÉCHON et al., 1998) amplificaram o DNA da estirpe controle de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, mas não das estirpes identificadas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* do estudo de (OLIVEIRA et al., 2003).

Ainda no Rio Grande do Sul, de 223 isolados, 53,4 e 43% foram identificados como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, e 3,6% também não se enquadravam na classificação bioquímica. *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, a principal responsável por causar canela preta, não foi detectada (EL TASSA; DUARTE, 2004), reforçando a hipótese de que outras espécies e/ou subespécies de pectobactérias podem causar o mesmo sintoma.

Dickeya chrysanthemi está distribuída em zonas tropicais, subtropicais e temperadas e pode estar presente no tecido infectado dependendo principalmente da temperatura (DE BOER, 2002). É importante ressaltar que ela tem se tornado importante patógeno da cultura da batata, devido expansão dessa para regiões quentes, sendo relatada também em cebolinha, mandioquinha-salsa, milho e tomateiro (DUARTE, 2003 apud HENZ, 2001; PÉROMBELON, OLIVEIRA, 2001; CHELLEMI

et al., 1998; ALMEIDA et al., 1997; DODAN et al., 1997; BECK, 1994; FERREIRA-PINTO et al., 1994; JABUONSKI et al., 1986; KELMAN, 1980; REIFSCHNEIDER; LOPES, 1980; ROBBS, 1980; DICKEY, 1979). Esta espécie pode ser diferenciada de *P. carotovorum* com base na organização dos genes para enzimas pectolíticas e nas sequências de DNA de regiões-chaves, tais como genes ribossomais 16S e regiões IGS. Mas é com base na produção de indol, na atividade da fosfatase e da sensibilidade à eritromicina que esta pectobactéria tem sido diferenciada das demais com sua diversidade dentro da espécie relacionada à especificidade hospedeira (DUARTE, 2003 apud SAMSON et al., 2001).

O gênero *Dickeya* apresenta células tipo bastonetes Gram negativos, com dimensões que variam de 0,5 a 3,0 μm e de extremidades arredondadas, ocorrendo isoladamente ou em pares, podendo também apresentarem-se em cadeias. É válido destacar ainda que são usualmente móveis por meio de flagelos peritríquios, aeróbias/anaeróbias facultativas que catabolizam a glicose através de processo fermentativo; reduzem o nitrato a nitrito; são pectinolíticas; produzem indol e crescem a 36°C, catabolizam (-)-arabinose, mio-inositol, (-)-D-malato, malonato, sacarato, e meso-tartarato e causam podridões moles e murchas vasculares em uma ampla gama de plantas hospedeiras (SAMSON et al., 2005; WALDEE, 1945; HAUBEN et al., 1998). As análises de genes de rRNA de 16S permitem aos membros do gênero *Dickeya* formarem uma chave determinada e a proporção de G-C do gênero varia de 56,4 a 59,5 em mol % (SAMSON et al., 2005).

A identificação fenotípica pode ser feita pelos testes: da fosfatase, produção de pigmento azul, gema de ovo (lecitinase), crescimento (rápido) a 37°C, produção de indol, sensibilidade à eritromicina, utilização de tartarato e de malonato (TAKATSU, 2007 APUD DYE, 1969; DICKEY, 1979; PEROMBELON, KELMAN, 1980). O teste de fosfatase é considerado o mais consistente, embora qualquer teste que resulte em positivo é uma indicação de que o isolado em estudo pode ser uma *Dickeya*, e que a identificação segura ao nível de espécie só será possível por meio de homologia DNA-DNA com as estirpes padrões das espécies descritas (TAKATSU, 2007).

2.6 Caracterização molecular de *Pectobacterium* spp.

Em virtude da variação genética dentro das pectobactérias, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) surge como ferramenta biotecnológica baseada na especificidade do desenvolvimento de oligonucleotídeos, iniciadores específicos produzidos a partir de uma sequência alvo de DNA, conhecidos e geralmente relacionados a genes de patogenicidade, dando maior precisão nos resultados dos testes (VIVIAN, 1992).

A reação da PCR consiste em etapas cíclicas de desnaturação da fita de DNA, anelamento dos oligonucleotídeos, extensão da fita de DNA mediante ação da enzima DNA polimerase (VIVIAN 1992, apud DUNCAN; TORRANCE, 1992; LOUWS et al., 1999). Esta técnica tem sido utilizada não só para detecção específica de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* e *Dickeya chrysanthemi*. As sequências-alvo para a identificação de *Pectobacterium* spp. são genes codificadores de pectato liases, metaloproteases ou sequências aleatórias de DNA, obtidas a partir de RFLP (BERTHEAU et al., 1998; DE BOER, WARD, 1995; SMID et al., 1995); mas também para diferenciação das demais pectobactérias, como é o caso dos oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') ECA1f (CGGCATCATAAAAACACG) / ECA2r (GCACACTT CATCCAGCGA) (DE BOER; WARD, 1995) que produzem um fragmento de 690 pb, específico para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; 1491f (GAAGTCGTAACA AGGTA) / L1RA (CAAGGCATCCACCGT) / L1RG (CAGGGCATCCACCGT) da região espaçadora intergênica (IGS), diferenciando *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (fragmentos de \approx 510 pb e \approx 550 pb) de *Dickeya chrysanthemi* (um fragmento adicional de 480 pb) (FESSEHAIE et al., 2002), e o EXPCCR (GCCGTAATTGCC TACCTGCTTAAG) / EXPCCF (CGC CATCATAAAAACAGC) (KANG et al., 2003) que gera um fragmento de 550pb e identifica *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ou *P. Carotovorum* subsp. *wansii* e exclui *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* e o Br1f (GCGTGCCGGGTTTATGACCT) /L1RA/L1RG que produzem um fragmento de 322 pb e diferencia *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* das demais pectobactérias (DUARTE et al., 2004).

Para a subespécie *P. carotovorum* subsp. *Brasiliensis*, foi proposto o oligonucleotídeo iniciador denominado BR1f, oriundo da região IGS, e baseado na enzima de restrição *SexAI*, a qual corta este região apenas desta subespécie, e usado

como o oligonucleotídeo L1r para detectar estirpes desta subespécie por meio da PCR (DUARTE et al., 2003).

Os polimorfismos nas regiões intergênicas, 16S-23S rDNA (IGS) também podem ser usados para diferenciar bactérias bastante interligadas, devido ao fato desta região não codificar para genes essenciais, havendo então uma pressão evolutiva diferente das outras regiões, apresentando-se em geral polimórfica (CHUN et al., 1999; FESSEHAIE et al., 2002; GRAHAM et al., 1997; LUZ et al., 1998).

A análise de polimorfismos de fragmentos amplificados aleatoriamente (RAPD) também distinguiu *P. carotovorum* de *Pseudomonas* spp. pectolíticas, bem como as subespécies *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (PARENT et al., 1996). A produção de um “DNA array”(conjunto de sondas de DNA) contendo mais oligonucleotídeos específicos para as diferentes pectobactérias poderá facilitar o processo de identificação, que é um dos principais entraves no estudo deste grupo de bactérias (DUARTE et al., 2003).

Este “array” pode se diferenciar em macroarray, microarray e biochips, de acordo com a quantidade de fragmentos de DNA (sondas) que são adicionados ao suporte sólido (reverse dot-blot), podendo ser membrana de náilon ou nitrocelulose (macroarranjos), ou lâmina de vidro para microarranjos ou biochips. Cada ponto no arranjo é composto de muitas sondas idênticas complementares a um gene de interesse. Durante a hibridização, um DNA alvo marcado encontra uma sequência complementar, se anela e forma um DNA de fita dupla (CALL, 2001).

Esta tecnologia possibilita a adição do aspecto multiplex, onde um grande número de oligonucleotídeos integrados a uma pequena área na superfície de um chip facilita e torna mais rápida a detecção simultânea de muitas sequências de genes (PALMA, 2006 apud LIEVENS; THOMMA, 2005; LÉVESQUE, 2001;; KURATA; SUYAMA, 1999).

A homologia de DNA com a mesma subespécie e as demais espécies e subespécies indicou 95-100% de similaridade entre *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, 80% com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, 72% com *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, 45% com *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* e 18% com *P. carotovorum* subsp. *wasabie* e *Dickeya chrysanthemi*. Estas informações sugerem que as estirpes brasileiras formam uma nova subespécie com alto grau de virulência e capacidade de disseminação para outras áreas geográficas (RIBAS, 2007).

2.7 Atribuições e uso de Percloroeto de Ferro

O percloroeto de ferro, cuja fórmula é $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, é um reagente químico que atua como coagulante, floculante para esgoto e resíduo industrial, catalisador, pigmento, agente para gravação e impressão, adubo, agente oxidante e corrosivo. Ele se hidrolisa progressivamente formando, ao final, complexos oxi - hidratados poliméricos, e apresenta-se como uma solução aquosa de caráter ácido na cor castanho escuro (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2011; SPUMOL QUIMICA, 2011), sendo assim, permite a reação em água e oxigênio do ambiente liberando moléculas de oxigênio e cloro; por essas características denota semelhança aos efeitos do perclorato (Informação verbal)².

Já o uso de perclorato é comum nos EUA a mais de 100 anos, principalmente na indústria bélica e outras. É um produto que além de trazer sérios problemas ambientais afeta também à saúde do homem, fazendo com que acumule iodo na glândula tireóide resultando em doenças como hipertireoidismo ou mesmo agravando a doença já existente (LOGAN, 1998).

O perclorato é considerado um composto que possui uma estabilidade química única sob condições ambientais e alta solubilidade. Devido a isso, a redução microbiana de perclorato foi identificada como um método viável para remediação de ambientes contaminados. No entanto, pouco se sabia sobre a diversidade e ubiquidade de microorganismos que podem crescer pela dissimilação de clorato ou “respiração do perclorato” (URBANSKY, 1998). Esse metabolismo foi associado a organismos que utilizam nitrato na respiração, e o clorato foi considerado um substrato coincidente para a nitrato redutase (CHAUDHURI, 2002 apud DE GROOT; STOUTHAMER, 1969; HACKENTHAL, 1965; HACKENTHAL et al., 1964). Entretanto, este fato não explica a presença de enzimas especializadas, tais como a redutase clorato “C”, purificadas de *Proteus mirabilis* as quais podem somente usar clorato como substrato.

Segundo Coates e colaboradores (1999), existem organismos capazes de reduzir metabolicamente o perclorato, desmembrando em moléculas de cloro e oxigênio. Os autores, trabalhando com alguns isolados dentre eles os *Dechlorosoma suillum* e *Dechloromonas agitata*, mostraram que eles são semelhantes de forma geral, como por exemplo, na massa molecular, sugerindo uma atividade específica em que um

² Informação fornecida pela Associação Brasileira da Batata (ABBA) em 2009.

único gene, que codifica para esta enzima redutora de perclorato, pode estar conservado nesses organismos que reduzem perclorato e que sua redução pode ser o resultado de um evento de transferência horizontal do gene.

Sob condições anaeróbicas, é possível que ocorra a redução de íons de cloro do perclorato por microorganismos envolvidos neste tipo de metabolismo respiratório (LOGAN, 1998).

Os microrganismos especializados podem crescer durante a redução anaeróbica de cloreto ou perclorato e reduzir completamente estes compostos a cloro (CHAUDHURI, 2002 apud ACHENBACH, et al., 2001;). Segundo os autores Coates e colaboradores (1999) Michaelidou e outros (2000) e Wallace e outros (1996), estes organismos são filogeneticamente diferentes, com representantes nas sub-classes α -, β -, γ -, e δ do Proteobacteria, com maioria presente na sub-classe β , sendo membros do gênero *Dechloromonas* ou *Dechlorosoma* (ACHENBACH et al., 2001; LOGAN et al., 2001; WU et al., 2001; MICHAELIDOU et al., 2000; BRUCE et al., 1999; COATES et al., 1999; RIKKEN et al., 1996; WALLACE et al., 1996; MALMQVIST et al., 1994; STEPANYUK et al., 1992; ROMANENKO et al., 1976).

A caracterização fenotípica tem demonstrado que a bactéria *Dechloromonas agitata*, conhecida como redutora de perclorato, possui grande capacidade metabólica, incluindo a oxidação de hidrogênio, ácidos orgânicos e alcoóis simples, hidrocarbonetos aromáticos, hexoses, redução de substâncias húmicas, ferro solúvel e insolúvel e sulfetos de hidrogênio. São conhecidas como anaeróbicas facultativas ou microaerofílicas, e algumas, mas não todas, usam nitratos na respiração alternativamente, reforçando a idéia de que a redução do perclorato não está relacionada com a redução do nitrato. A enzima cloreto desmutase estava presente na membrana externa de todas as bactérias redutoras de perclorato, e somente expressou quando os organismos foram cultivados anaerobicamente na presença do perclorato ou do clorato (CHAUDHURI et al., 2002).

Estudos para tratamentos de solos e águas subterrâneas contaminados, com a aplicação de amido em combinação com bactérias amidolíticas e casca de batata (OKEKE; FRANKENBERGER JR, 2005), foram efetivos na remoção do perclorato (ClO_4^-) da água, indicando ser um ótimo meio de diminuir a contaminação dos solos e águas subterrâneas, pois além de econômica, quando comparada aos outros meios de tratamento de tecnologia físico-químicos, é também mais rápida.

2.8 Transporte e armazenamento de batatas

A batata é um alimento nobre e muito apreciado pelo consumidor brasileiro. A manutenção da qualidade e da boa imagem do produto junto ao público deve ser uma preocupação constante de todos os envolvidos no sistema produtivo, para que a batata continue sendo parte da alimentação diária do brasileiro (HENZ; BRUNE, 2004).

A batata normalmente é comercializada após ser lavada, sendo empacotada em malhas com 1 ou 2 kg, eventualmente com 5 kg, ou então à granel, onde o próprio consumidor inspeciona e seleciona os tubérculos (ALVES, 2011).

Eventualmente, em algumas regiões específicas, a batata é apresentada ao consumidor apenas escovada. A decisão de lavar ou não a batata depende de vários fatores, tais como a cultivar, o tipo de solo em que foi cultivada, condição climática na colheita, aparência do tubérculo, mercado de destino e hábito do consumidor. A principal vantagem da lavagem é a melhora da aparência do tubérculo, evidenciando as qualidades do produto (ALVES, 2011). Entre as desvantagens, pode-se considerar a elevação dos custos e conseqüentemente do preço final ao consumidor. Além disso, acelera a deterioração dos tubérculos, causada por patógenos pós-colheita, e aumenta a suscetibilidade ao esverdeamento.

Outro ponto a ser considerado é a qualidade da água usada no processo de lavagem, que deve ser tratada ou proveniente de poço artesiano, evitando-se a água de rios e açudes que podem estar contaminadas. A lavagem dos tubérculos, apesar de ser prática predominante, é questionável, pois pode acentuar os seus defeitos e ainda torná-los mais suscetíveis à deterioração, além de aumentar a porcentagem de descarte (FERREIRA; NETO, 2007 apud FINGER; FONTES, 1999, HENZ; BRUNE, 2004). As perdas pós-colheita para a batata não lavada pode ser em torno de 10,3% e 93% para a batata lavada, constatando, portanto, que o processo de lavagem aumenta a incidência de deterioração (FERREIRA; NETTO, 2007).

No processo de pós-colheita, a batata é transportada em caminhões, usualmente acondicionada em sacos de 50 kg. Apesar de ser considerado um produto bastante resistente a injúrias mecânicas, deve-se evitar o manuseio excessivo dos sacos e pilhas muito altas, para não causar danos aos tubérculos. Outro cuidado que deve ser tomado nesta etapa é a não exposição direta ao sol. A exposição pode causar esverdeamento e murchamento do tubérculo pela perda de água. Quando possível, o transporte a longas distâncias deve ser feito em caminhões com lona térmica, organizando-se a carga de

modo a permitir uma melhor aeração entre os sacos, evitando-se assim que aqueles localizados na parte inferior da carroceria fiquem excessivamente úmidos e quentes (ALVES, 2011). Na prática, porém, o que se tem observado para a batata-consumo é que o acondicionamento nestas sacas tem causado enormes prejuízos, pelas deteriorações iniciadas nos tubérculos esfolados e batidos dentro desta embalagem pesada, que não oferece adequada proteção ao produto e ainda penosamente movimentada nos processos manuais de carga e descarga (CALBO, 2011).

Durante o transporte, as perdas variam de acordo com as estações do ano, sendo mais intensas em épocas chuvosas. Além disso, o mau estado de conservação das estradas brasileiras, associado às altas temperaturas que ocorrem no Brasil aceleram a deterioração, de forma que as perdas de produtos perecíveis, como hortaliças, podem alcançar 30% (CAIXETA FILHO, 1999). Não sendo possível o uso de veículos refrigerados, as cargas devem ser protegidas com lonas limpas e de cores claras, garantindo a circulação de ar, para evitar o abafamento e calor excessivo (ARRUDA, 2004).

No Brasil, diferentemente de outros países produtores de batatas, o plantio e a colheita ocorrem praticamente durante todo o ano e em distintas regiões. Por consequência, sua oferta é contínua, não havendo necessidade de armazenamento prolongado do produto como acontece em outros países, como por exemplo, na França. Por isso, a batata para consumo é geralmente comercializada em um prazo de até quinze dias após a colheita. Embora as batatas sejam destinadas rapidamente ao mercado consumidor ou à indústria, podem existir algumas situações em que o armazenamento refrigerado possa ser útil, sendo recomendado mantê-las sob temperatura de 0°C e 80°C a 90% de umidade relativa do ar, com ventilação adequada. Temperaturas abaixo de 0 °C não são recomendadas, pois podem ocasionar acúmulo de sacarose e açúcares redutores, o que é indesejável deixando a batata escura quando preparada na forma de fritas ou “chips”. No caso de não dispor-se de câmaras frigoríficas, os tubérculos podem ser armazenados em locais frescos e bem ventilados, preferencialmente escuros e sem incidência de luz direta, tais como porões e galpões, que permitam manter a temperatura relativamente constante (ALVES, 2011).

O armazenamento de cada produto deve ser feito segundo suas exigências e tolerâncias de temperatura, umidade relativa e circulação de ar, nos armazéns ou câmaras frigoríficas (MARTINS; FARIA, 2002). Em muitos casos, é aconselhável a realização de um pré resfriamento antes da armazenagem. Dessa forma, é removido

rapidamente o calor dos produtos perecíveis, ficando a temperatura próxima daquela que será utilizada durante o período de armazenamento ou transporte. Ressalte-se que para que a manutenção da qualidade dos produtos, ao longo de toda a pós-colheita, até o consumidor final, seja mantida, é necessário o uso de ar refrigerado contínuo.

A falta de cuidado na hora da colheita, no uso de máquinas e equipamentos desregulados, bem como transporte e armazenamentos inadequados são apontados como as causas de perdas altamente significativas em todas as cadeias produtivas. As perdas quantitativas incluem, entre outras, principalmente os danos mecânicos, ocasionados frequentemente em operações de pré-colheita, colheita e de manuseio, tais como classificação, embalagem e transporte. Normalmente, são portas de entradas para invasões e crescimento de patógenos, perda de peso, sabor, firmeza e mudança de coloração (CRISOSTO et al., 1997). As injúrias mecânicas (batidas, quedas, cortes, esmagamentos, abrasões e rachaduras) têm sido identificadas como as principais perdas na qualidade pós-colheita. Os danos físicos são a principal causa de perdas no varejo, sendo que as doenças patogênicas fisiopatias (distúrbios fisiológicos) geralmente ocorrem devido a fatores pré e pós-colheita e são devidas, principalmente, ao estado de maturidade do produto, condições de armazenamento como temperatura e umidade relativa do ar (MARTINS; FARIAS, 2002).

Para o controle de doenças durante estocagem, Olivier e colaboradores (1998,1999) e Hervieux e outros (2002) propuseram como alternativa a aplicação de sais orgânicos e inorgânicos na manutenção de tubérculos de batata estocados, reduzindo o desenvolvimento da sarna prateada, por exemplo. Yaganza e colaboradores (2004), com o mesmo propósito também obtiveram eficiência no controle de doenças nos tubérculos estocados.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, L. A.; et al. *Dechloromonas agitata* N.N. gen., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* N.N. gen., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v. 51, p. 527–533, 2001.
- AGRIANUAL 2011. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p.482, 2011.
- ALMEIDA, I.M.G.; MALAVOLTA JR., V.A.; RODRIGUES NETO, J. Novas ocorrências de *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* e *Erwinia chrysanthemi* em plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, p. 85-90, 1997.
- ALVES, E. **Cultivo da batata**. [20-?]. Disponível em: <[http:// pt.scribd.com /doc/ 33021630/ cultivo-da-batata](http://pt.scribd.com/doc/33021630/cultivo-da-batata)>. Acesso em 04 Nov. 2011.
- ARRUDA, C. R. **Análise das etapas do processamento de batata chips**. 2004. 46 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Engenharia de alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos- Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2004.
- BECK, K. Spread of *Erwinia chrysanthemi* in *Kalanchoe blossfeldiana*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 141, p. 285-292, 1994.
- BENELLI, A.I.H., et al. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p.155-159, 2004.
- BERIAM, L, O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p.81-84, 2007.
- BERTHEAU, Y.; et al. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: PÉROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J.M. (Eds.). Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* potatoes. **Laboratory Manual Dundee**, Scotland, p. 38-48, 1998.
- BORGES, M., LUZ, J. M. Q., SILVA, I. R., FRANÇA, R. O. **O cultivo da batata no Brasil**: aspectos gerais da cultura. Itapetininga, SP: Associação Brasileira da Batata, 156 p; 2008.
- BURKHOLDER, W. H., FADDEN, M. C. L. A, DIMOCK, A. W. A bacterial blight of chrysanthemum. **Phytopathology**, Saint Paul, v.43, p. 522-526, 1953.
- BRADBURY, J. **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**. Ferry Lane: International. 1986. 64p.

BRASIL. Portaria nº 154, de 23 de Julho de 1987: **Normas Gerais para certificação de batata-semente**. Disponível em: < [http:// www.engetecno. com.br/port/legislacao /fv _batata_semente.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/fv_batata_semente.htm)>. Acesso em: 29 de nov. 2011.

BRUCE, R. A.;ACHENBACH, L. A.; D. COATES, J. Reduction of (per)chlorate by a novel organism isolated from a paper mill waste. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.1, p. 319–331, 1999.

CALL, D. DNA microarrays- their mode of action and possible applications in molecular diagnostics. **Veterinary Sciences Tomorrow**, Utrecht, n.3, p. 1-9, 2001.

CAIXETA FILHO, J.V. Losses in the transportation of fruits and vegetables: A Brazilian case study. **International Journal of logistics: Research and applications**, v. 2, n. 3, 1999.

CALBO, A. G. **Batata** (*Solanum tuberosum*). Disponível em: <[http: //www. cnph. em brapa.br/laborato/pos_colheita/batata.htm](http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos_colheita/batata.htm)>. Acesso em 04 Nov. 2011.

CHAUDHURI, S. K.; et al. Environmental Factors That Control Microbial Perchlorate Reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4425–4430, 2002.

CHELLEMI, D.O.; DANKERS, H.A.; HILL, K.; Occurrence of bacterial stem rot, caused by *Erwinia chrysanthemi* , on field-grown tomato in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 831, 1998.

CHUN, J.; HUQ, A.; COWELL, R.R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenetic spacer regions of *Vibrio cholera* and *Vibrio mimicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.2201-2208, 1999.

COATES, J. D., et al. Ubiquity and diversity of dissimilatory (Per)chlorate-reducing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5234–5241, 1999.

CRISOSTO, C. H.; JOHNSON, R. S.; DEJONG, T. Orchard factors affecting post harvest stone fruit quality. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 5, p. 820-823, 1997.

CZAJKOWSK, R.; et al. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 999–1013, 2011.

DE GROOT, G. N.; STOUTHAMER, A. H. Regulation of reductase formation in *Proteus mirabilis*. I. Formation of reductases and enzymes of the formic hydrogen lyase complex in the wild type and in chlorate resistant mutants. **Archive of Microbiology**, Berlin, v. 66, p. 220–233, 1969.

DE BOER, S. H.; et al. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 63, p. 487-495, 1987.

DE BOER, S.H.; WARD, L.J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p. 854-858, 1995.

DE BOER, S.H. Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. **Plant Disease**, Saint Paul, v, 86, p. 960-964, 2002.

DICKEY, R. S. *Erwinia chrysanthemi*: a comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 324-329, 1979.

DODAN, D.S.; SINGH, R.; SUNDER, S. Patter of rice disease in Haryana. **Plant Disease Resistance**, Saint Paul, v. 12, p.188-191, 1997.

DUARTE, V. Taxonomia do gênero *Erwinia*. **Revisão Annual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.7, p.197-212, 1999.

DUARTE, V.; et al. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* subsp. nov. associated with blackleg of potato in Brazil. In: **Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology**, Christchurch, p.12, 2003.

DUARTE, V.; et al. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 535-545, 2004.

DUARTE, V., EL TASSA, S. O. M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p.1-41, 2003.

DYE, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The “*carotovora*” group. **New Zealand Journal of Science**. Wellington, v. 12, p. 81–97, 1969.

ELPHISTONE, J.G. La pudrición blanca y la pierna negra de la papa *Erwinia* spp. Lima: CIP. **Boletín de Información Técnica**, Lima, n.21, 1987.

EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de Pectobactérias em tubérculos de batata-semente no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29,n.6, p. 620-625, 2004.

ESPUMOL QUÍMICA. **Cloreto férrico**. 2011. Disponível em: <<http://www.spumol.com.br>>. Acesso em 16 dez. 2011.

EVANGELISTA, R. M.; NARDIN, I.; FERNANDES, A. M.; SORATTO, R. P. Qualidade Nutricional e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 953-960, 2011.

FERNANDES, A. M.; et al. Crescimento, acúmulo e distribuição de matéria seca em cultivares de batata na safra de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 826-835, 2010.

- FRÉCHON, D.; et al. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. **Potato Research**, Wageningen, v. 41, p.163-173, 1998.
- FERREIRA, M. D; NETTO, L. H. Avaliação de processos nas linhas de beneficiamento e classificação de batatas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 279-285, 2007.
- FERREIRA-PINTO, M.M.; CRUZ, M.L.; OLIVEIRA, H. The occurrence in Portugal of the bacterial disease of maize crops caused by *Erwinia chrysanthemi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p.1050-1054, 1994.
- FESSEHAIE, A.; DE BOER, SH.; LEVESQUE, C.A. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenetic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal Microbiology**, Montreal, v. 48, p.387-398, 2002.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV. p. 161-192, 2003.
- FINGER, F.L.; FONTES, P. C. R. Manejo póscolheita da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, p. 105-111, 1999.
- FONTES, P. C.. Cultura da Batata. In: FONTES, P. C. R. (Ed.). **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa-MG: UFV, 2005. p. 323-343.
- FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Classificação e Descrição Botânica. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. (Eds.). O cultivo da batata na região sul do Brasil. Brasília- DF: Embrapa Informação Tecnológica, **EMBRAPA clima Temperado**. Pelotas, p. 69-79, 2003.
- FURUMOTO, O.; LOPES, C. A. Batata-semente. In: LOPES, C. A.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.). Brasília, DF: EMBRAPA-CNPq, **Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças**, 8. p. 8-9, 1997.
- GARDAN, L.; et al. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov., and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v.53, p.381-391, 2003.
- GRAHAM, T.; et al. Inter-and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v.47, p.863-869, 1997.
- GUTELL, R.R.; LARSEN, N.; WOESE C.R. Lessons from an evolving rRNA: 16S-23S structures from a comparative perspective. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, Califórnia, v. 58, p.10-26, 1994.
- HACKENTHAL, E.; et al. Die Reduktion von Perchlorat durch Bakterien. I. Untersuchungen an Intaken Zellen. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 13, p. 195-206, 1964.

HACKENTHAL, E. Die Reduktion von Perchlorat durch Bacterien. II. Die Identitat der Nitratreduktase und des Perchlorat Reduzierenden Enzyms aus *B. cereus*. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 14, p.1313–1324, 1965.

HAUBEN, L.; et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, p. 384-397, 1998.

HENZ, G.P. **Perdas pós-colheita e métodos de manejo da podridão mole causada por *Erwinia chrysantemi* em mandioquinha-salsa**. 2001. 256 f. (Doutorado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília- Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Brasília, 2001.

HENZ, G. P; BRUNE, S. Redução de perdas pós-colheita em batata para consumo. Brasília: **Embrapa** (Circular Técnica 34). 10 p; 2004.

HERVIEUX, V.; et al. Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1014-1018, 2002.

HIRANO, E. Batata-semente Básica, registrada e Certificada. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. (Ed.). O cultivo da batata na região sul do Brasil. Brasília- DF: Embrapa Informação Tecnológica. **EMBRAPA clima Temperado**. Pelotas, p. 475-493, 2003.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento de safras agrícolas no ano civil. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1819&id_pagina=1>. Acesso em: 11 de nov. 2011.

JABUONSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p. 185-195, 1986.

KANG, H. W.; KWON, S. W.; GO, S. J. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 127-133, 2003.

KURATA, K. L., SUYAMA, A. Probe desing for DNA chips. **Japanese Society Bioinformatics**, Tokyo, p. 1-2, 1999.

LÉVESQUE, C. A. Molecular methods for detection of plant pathogens- What is the future? **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 23, n. 4, p. 333-336, 2001.

LIEVENS, B., THOMMA, B. P. H. J. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 12, p. 1374-1380, 2005.

LOGAN, B. E. A review of chlorate- and perchlorate- respiring microorganisms. **Bioremediat Journal**, London, v. 2, P. 69-79, 1998.

LOGAN, B. E.; et al. Kinetics of perchlorate- and chlorate-respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2499–2506, 2001.

LOPES, C. A. **Botânica da batata**. Batata. Net. 2002. Disponível em: <<http://www.batatas.com.br/cultivo/botanica.asp>>. Acesso em: 25 out. 2011.

LOPES, C. A. Introdução. In: LOPES, C. A.; BUSO, J.A. (Ed.). Cultivo da Batata (*Solanum tuberosum* L.). Brasília- DF: Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças 8, **EMBRAPA-CNPQ**. p. 1-2, 1997.

LOUWS, F.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity detection and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, Califórnia, v. 37, p. 81-125, 1999.

LUMB, V. M.; PÉROMBELON, M.C.M.; ZUTRA, D. Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 35, p. 196-202, 1986.

LUZ, P.S.; RODRIGUES-VALERA, F.; REEVES, P.R. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella anserina* subspecies. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p.2144-2151, 1998.

MALMQVIST, A.; et al. *Ideonella dechloratans* gen. nov., sp. nov., a new bacterium capable of growing anaerobically with chlorate as an electron acceptor. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 17, p. 58–64, 1994.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R. de M. Produção de alimentos X desperdício: Tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola- Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 20-32, 2002.

MASVELT, E.L.; CARSTENS, E. Outbreak of *Erwinia carotovora* on *Zantedeschia* spp. In South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 966-66, 1999.

MICHAELIDOU, U.; ACHENBACH, L. A.; D. COATES, J. Isolation and characterization of two novel (per)chlorate-reducing bacteria from swine waste lagoons. In: Urbansky, E.D (ed.). **Perchlorate in the environment**. Kluwer Academic/Plenum, New York, 2000, p. 271–283.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). **Manual de Produtos Químicos Perigosos: Ficha de Informação de Produto Químico-Cloreto férrico**. 2011. Disponível em:<<http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/emergencias-quimicas/258-manual-de-produtos-quimicos>>. Acesso em 07 jun. 2011.

OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER JR, W. T. Use of starch and potato peel waste for perchlorate bioreduction in water. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 347, p. 35– 45, 2005.

OLIVEIRA, A. M. R. de. **Incidência e variabilidade genética de Erwinias Pectolíticas associadas à canela preta em lavouras de batata no Estado do Rio Grande do Sul**. 2001. 89 f. Tese (Doutorado em Fitossanidade)- Faculdade de Agronomia - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

OLIVEIRA, A. M. R.; et al. Incidence of pectolytic *Erwinia* associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 28, p.49-53, 2003.

OLIVIER, C.; MACNEIL, C. R.; LORIA, R. Application of organic and inorganic salts to field-grown potato tubers can suppress silver scurf during potato storage. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 814-818, 1999.

OLIVIER, C.; et al. Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 213-217, 1998.

PALMA, J. **Seleção de Oligonucleotídeos iniciadores visando compor um arranjo de sondas de DNA que identifique estirpes de pectobactérias**. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área Fitossanidade)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

PARENT, J. G., LACROIX, M., PAGÉ, D. Identification of *Erwinia Carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 494-499, 1996.

PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. (Ed.). O cultivo da batata na região sul do Brasil. Brasília- DF: EMBRAPA Informação tecnológica. **EMBRAPA Clima Temperado**. Pelotas, 567 p, 2003.

PÉROMBELON, M. C. M., KELMAN, A. Ecology of the soft rot erwinias. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, Califórnia, v. 18, p. 361-87, 1980.

PÉROMBELON, M.C.M.; KELMAN, A. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: proposal for revision of terminology. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 283-285, 1987.

PÉROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J. M. (Eds.). Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potatoes. Laboratory Manual. **Scottish Crop Research Institute**, Dundee, 1998.

PÉROMBELON, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 1-12, 2002.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; LOPES, C.A. Ocorrência da podridão bacteriana do topo e do colmo do milho no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.5, n.3, p.447, out. 1980. Resumo.

RIBAS, A. D. **Detecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* em plantas de batata através de PCR com oligonucleotídeos iniciadores a partir de sequências dos genes *pnl* e *rdg***. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área Fitossanidade)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

RIKKEN, G.; KROON, A.; VAN GINKEL, C. Transformation of (per) chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: reduction and dismutation.

Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 45, p. 420–426, 1996.

ROBBS, C. F. *Erwinia chrysanthemi* agente de uma podridão mole de cebolinha.

Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.5, n. 3, p. 453, 1980. Resumo.

ROMANENKO, V. I.; KORENKOV, V. N.; KUZNETSOV, S. I. Bacterial decomposition of ammonium perchlorate. **Mikrobiologiya**, Moscow, v. 45, p. 204–209, 1976.

SAMSON, R.; et al. Six new species are delineated within *Erwinia chrysanthemi*. In: De Boer, S.H. (ed.). Plant Pathogenic Bacteria. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 10., 2001, Dordrecht. **Proceedings...** The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 150.

SAMSON, R.; et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v. 55, p. 1415–1427, 2005.

SEO, S. T., KOO, J. H., LIM, C. K. Characterization of Korean *Erwinia carotovora* strains from potato and Chinese cabbage. **Plant Pathology Journal**, Oxford, v. 20, p. 283-288, 2004.

SMID, E.J.; JANSEN, A.H.J.; GORRIS, L.G.M. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, Oxford, v. 44, p. 1058-1069, 1995.

SMITH, C.; BARTZ, J.A. Variation in the pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, p.505-509, 1990.

STANGHELLINI, M.E.; MENELEY, J.C. Identification of soft rot *Erwinia* associated with blackleg in Arizona. **Phytopathology**, Saint Paul v. 65, p. 86-87, 1975.

STEPANYUK, V.; SMIRNOVA, G.; KLYUSHNIKOVA, T.; KANYUK, N.; PANCHENKO, L.; NOGINA, T.; PRIMA, V. New species of the *Acinetobacter* genus *Acinetobacter thermotoleranticus* sp. nov. **Mikrobiologiya**, Moscow, v. 61, p. 347–356, 1992.

- TAKATSU, A. Erwinias do grupo *carotovora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 535-536, 1983.
- TAKATSU, A. Taxonomia de *Dickeya*- um novo gênero de Bactéria Fitopatogênica. **Revista Anual de Patologia Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 1-44, 2007.
- TOTH, I. K.; et al. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 17-30, 2003.
- URBANSKY, E. T. Perchlorate chemistry: implications for analysis and remediation. **Bioremediation Journal**, London, v. 2, p. 81-95, 1998.
- VAN DER MERWE, J. J., COUTINHO, T. A., KORSTEN, L., VAN DER WAALS, J. E. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 175-185, 2010.
- VIVIAN, A. Identification of plant pathogenic bacteria using nucleic acid technology. In: Duncan, J. M., Torrance, L. **Techniques for the rapid detection of plant pathogens**. The British Society for Plant Pathology, Inglaterra, Blackwell Science Inc, 1992, p. 256.
- WALLACE, W.; et al. Identification of an anaerobic bacterium which reduces perchlorate and chlorate as *Wolinella succinogenes*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 16, p. 68-72, 1996.
- WU, J.; UNZ, R. F.; et al. Persistence of perchlorate and the relative numbers of perchlorate- and chlorate-respiring microorganisms in natural waters, soils, and wastewater. **Bioremediation Journal**, London, v 5, p. 119-130, 2001.
- YAGANZA, E.S.; ARUL, J.; TWEDDELL, R. J. Effect of pre-storage application of different organic and inorganic salts on stored potato quality. **Potato Research**, Wageningen, v. 46, p. 167-178, 2004.
- YOUNG, J.M.; TAKIKAWA, Y.; GARDAN, L.; STEAD, D.E. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, Califórnia, v. 30, p.67-105, 1992.

CAPÍTULO 2

RESUMO

Concentração de percloroeto de ferro e escala de notas para indicação de *Pectobacterium* spp. em tubérculos de batata

O percloroeto de ferro, devido suas propriedades químicas e sua coloração marrom bem característica, poderá permitir seu uso como indicador de bactérias em tubérculos de batata. Assim, o objetivo deste experimento foi determinar a concentração de percloroeto de ferro, o tempo de imersão dos tubérculos de batata na solução e o tempo após imersão, para avaliação do surgimento de manchas para a detecção de *Pectobacterium* spp. e também o desenvolvimento de uma escala de notas para avaliação da presença da bactéria. O experimento foi realizado no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Federal de Uberlândia, MG no período de março a abril de 2009. Tubérculos de batata foram imersos por 10, 20 e 30 minutos na solução de percloroeto de ferro a 0,0; 8,4; 21,0 e 42,0% e avaliados após 10, 20 e 30 minutos em temperatura ambiente, e a testemunha, a qual os tubérculos não foram imersos. As avaliações foram feitas usando notas, onde: A= ausência de sinais; B= presença de sinais leves e C= presença de sinais nítidos. Foram feitas médias das observações visuais de quatro repetições na ocorrência de manchas escuras nos tubérculos de batata, por três avaliadores. Para determinação da escala de notas, foram utilizadas as mesmas concentrações do produto, e avaliadas após 10 e 20 minutos de imersão, com três repetições por tratamento. A avaliação foi estabelecida de acordo a escala de notas: nota 0 = sem pinta escura; 1 = poucas pintas escuras (1-25% lesões com 1 mm de diâmetro); 2 = pintas escuras médias (26-50% lesões com 2 mm de diâmetro); 3 = pontos escuros entre as lenticelas (51-75% lesões de 3 a 5 mm de diâmetro) e 4 = pontos escuros entre as lenticelas (76-100% lesões de 4 a 10 mm de diâmetro). Foi utilizado o teste de estimativa de proporções na busca do melhor tempo de avaliação para aplicar as notas. A concentração de percloroeto a 21%, com 10 minutos de imersão e 20 minutos após no ambiente, foi a mais indicada para avaliação através da escala de notas no surgimento das manchas nos tubérculos de batata.

Palavras-chave: podridão mole, cv. Ágata, *Solanum Tuberosum*

ABSTRACT

Iron perchlorate concentration and rating scale for the indication of *Pectobacterium* spp. in potato tubers

Due to its chemical properties, iron perchlorate presents a characteristic brown color, thus allowing its use as a bacteria indicator in potato tubers. Therefore, this study determined the concentration of iron perchlorate, the immersion time of potato tubers in the solution and the time after immersion for the evaluation of the appearance of spots for the detection of *Pectobacterium* spp. and also the development of a rating scale to evaluate the presence of bacteria. The experiment was done in the Laboratório de Fitotecnia at the Universidade Federal de Uberlândia, MG, from March to April 2009. Averages of visual observations were made of the occurrence of dark spots in four repetitions by three evaluators, applying “ratings” after each immersion time and exposition to the environment, qualifying the samples from the treatments: 0; 8,4; 21 or 42% iron perchlorate, immersed for 10, 20 or 30 minutes in the solutions and evaluated after 10, 20 and 30 minutes at the environment. The evaluation criteria were: symptomless (A), presence of slight symptoms (B), and presence of clear symptoms (C). The determination of the ratings was done using the same treatments as the product concentration, and evaluated after immersion for 10 or 20 minutes, with three repetitions per treatments. The evaluation was done according to a rating scale: rating 0 = with no dark spots; 1 = few dark spots (1-25% lesions of 1 mm diameter); 2 = median dark spots (26-50% lesions of 2 mm diameter); 3 = dark spots among the lenticels (51-75% lesions of 3 to 5 mm diameter); and 4 = dark spots among the lenticels (76-100% lesions of 4 to 10 mm diameter). The test of proportion estimation was used for the determination of the best evaluation time to apply the ratings. The best treatment in the determination of the iron perchlorate concentration was 21%, immersed for 10 minutes, and remaining on the environment for 20 minutes to apply the ratings for spot appearance in the tubers of potatoes.

Keywords: soft rot, cv. Ágata, *Solanum Tuberosum*

1 INTRODUÇÃO

O percloroeto de ferro, devido suas propriedades químicas, com capacidade para corrosão de placas metálicas de circuitos elétricos, além de floculante no tratamento de água e esgoto, apresenta uma coloração marrom bem característica, permitindo seu uso como um indicador, uma vez que ele pode apresentar reação de oxidação em contato com oxigênio do ar e da água. Também é utilizado na França na detecção de injúrias mecânicas para tubérculos armazenados em longo prazo, devido ao inverno rigoroso, disponibilizando-os ao mercado na medida do necessário (informação verbal)³.

O produto também é considerado um problema ambiental, em especial nos EUA, pois é um contaminante de solos, encontrado no ambiente introduzido por meio da ação antrópica, incluindo seus compostos em grandes quantidades na forma de desinfetantes, agentes clareadores e herbicidas, trazendo sérios problemas de saúde ao homem (OKEKE, 2005).

Até o momento, não há relatos na literatura do uso de percloroeto de ferro como indicador na detecção de bactérias em tubérculos de batatas, e nem para produtos químicos que realizam efeito semelhante. Desta forma, o que se encontra relativo à escalas de notas são critérios basicamente sensoriais, como a escala de notas desenvolvida por Peryam e Giradort (1952), denominada de escala hedônica. Esta escala tem finalidade de aplicar notas que vão de 1 a 9, com relação principalmente a aparência dos produtos e o gosto (sabor), e as escalas de notas que podem ser aritméticas ou logarítmicas, como um método dos fitopatologistas quantificarem a intensidade e principalmente a severidade de doenças nas plantas. Como o próprio nome sugere, utilizam-se escalas contendo notas equivalentes a classes de severidade de doenças (MAFFIA et al., 2007).

Trabalhos como os de Azzolini e colaboradores (2004), avaliando a influência dos estádios de maturação na qualidade pós-colheita de goiabas ‘Pedro Sato’, verificaram que os frutos colhidos nos estádios 2 (cor da casca verde-clara) e 3 (cor da casca verde-amarela) de maturação não diferiram quanto às características físico-químicas, ao final do período comercializável, porém apresentaram diferenças significativas quanto às características sensoriais. Utilizando a mesma escala de notas estabelecida por Peryam e Giradort (1952), Pataro e Silveira Júnior (2004)

³ Informação fornecida pela Associação Brasileira da Batata (ABBA) em 2009.

desenvolveram uma metodologia que possibilitasse calcular o parâmetro *degree-time* (DT), determinando sua relação com a vida de prateleira da rúcula, utilizaram provadores não-treinados que atribuíram notas de 1 a 9 para aparência geral, indicando a possibilidade de compra com 5 opções, determinando que a perda de qualidade do produto para a venda ocorria no momento em que a média das notas de aparência geral fosse inferior a 5, ou a maioria dos provadores declarasse que, possivelmente, ou, certamente, não compraria o produto. Assim, eles concluíram que a semelhança entre os dois métodos analisados é refletida na mesma vida de prateleira e iguais para ensaios com o mesmo tempo de espera para o resfriamento e temperatura de estocagem. Estes trabalhos comprovam o uso dessas notas em produtos no pós-colheita no processo da cadeia produtiva.

Existem autores que estipulam suas próprias escalas de notas na avaliação de seus produtos, talvez pela falta de escalas de notas apropriadas aos seus estudos. Sendo assim, os autores Durigan e outros (2005) criaram um sistema de notas para avaliarem os efeitos de diferentes injúrias mecânicas na qualidade de limas ácidas ‘Tahiti’, testando três tipos de lesões: impacto, compressão e corte, a cada 3 dias, quando se determinou a aparência, mediante a atribuição de notas (4 = ótimo; 3 = bom; 2 = regular ou sem condições de comercialização; 1 = ruim ou impróprio para o consumo) às mudanças na massa fresca dos frutos, à coloração e análises químicas. Os resultados mostraram que a aparência dos frutos, aos 9 dias de armazenamento, ficou comprometida.

Dessa forma, o objetivo deste experimento foi determinar a concentração de percloro de ferro, o tempo de imersão dos tubérculos na solução necessário para manifestação de sintomas – “manchas escuras” – possível indicadora de apodrecimento de tubérculos de batata, e a determinação de uma escala de notas para avaliação dos tubérculos com sinais de *Pectobacterium* spp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Concentração de percloroeto de ferro para indicação de *Pectobacterium* spp. em tubérculos de batata

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Federal de Uberlândia, no período de março a abril de 2009. Foram utilizados tubérculos de batata cv. Ágata, classificação especial, provenientes de Araxá e Patrocínio, MG.

Os tubérculos de batata foram colocados em redes de nylon e imersos em soluções de percloroeto de ferro a 0,0; 8,4; 21,0 e 42,0%, por 10, 20 e 30 minutos. Em seguida, retirados e deixados secar a temperatura ambiente, por 10, 20 e 30 minutos. A testemunha foi representada por uma amostra de batatas secas (não foi imersa na solução). As soluções foram preparadas em baldes de plástico com capacidade para 5 litros.

O ensaio constou de quatro repetições, sendo cada repetição composta de 6 tubérculos.

A avaliação foi feita por três avaliadores, pela observação da presença de manchas escuras nos tubérculos, possível indicadora de injúrias, usando uma escala de notas, onde: A = ausência de sinais; B = presença de sinais leve e C = presença de sinais nítido.

2.2 Determinação da escala de notas para indicação de *Pectobacterium* spp. em tubérculos de batata

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Federal de Uberlândia, nos meses de março a abril de 2009. Foi utilizado um (01) saco de batata de 50 kg da variedade Ágata, da região de Santa Juliana – MG, classificação primeirinha.

A realização deste experimento procedeu-se da mesma forma como no item 2.1, embora secaram a temperatura ambiente por apenas 10 e 20 minutos e cada repetição foi composta de 10 tubérculos. Os critérios das notas foram baseados na quantidade e tipo de lesão/mancha escura formado após cada tempo de imersão e, posteriormente, de contato com o ambiente. Como o percloroeto de ferro é um produto oxidativo, quando

ele entra em contato com oxigênio, tende a corroer e escurecer as superfícies que toca, formando manchas marrom escuras no decorrer do tempo.

A avaliação foi feita, por três avaliadores, pela observação da presença de manchas escuras nos tubérculos, usando uma escala de notas, onde: nota 0 = sem mancha escura; 1 = poucas manchas escuras (1-25% lesões com 1 mm de diâmetro); 2 = manchas escuras médias (26-50% lesões com 2 mm de diâmetro); 3 = manchas escuras entre as lenticelas (51-75% lesões de 3 a 5 mm de diâmetro) e 4 = manchas escuras entre as lenticelas (76-100% lesões de 4 a 10 mm de diâmetro) (Anexo A2).

2.2.1 Delineamento experimental

Para estimar a proporção de notas provenientes de dois tempos de leitura (10 e 20 minutos), utilizou-se um intervalo de confiança exato para o estimador de máxima verossimilhança de “ p ”. Neste, utiliza-se a distribuição F (LEEMIS; TRIVEDI, 1996). O intervalo de confiança (IC) para proporção (p) populacional é apresentado a seguir:

$$IC(p)_{1-\alpha} : [LI; LS] : \left[\frac{1}{1 + \frac{n-y+1}{yF_{2y; 2(n-y+1); \frac{1-\alpha}{2}}}}; \frac{1}{1 + \frac{n-y}{(y+1)F_{2(y+1); 2(n-y); \frac{\alpha}{2}}}} \right], \quad (1)$$

em que, LI = o limite inferior e LS o limite superior do intervalo de confiança estimado, $1 - \alpha$ = o nível de confiança da fórmula 1, sendo que foi fixado em 95%, α = o nível de significância, F refere-se a probabilidade $\alpha/2$ e $1-\alpha/2$ da cauda superior direita da distribuição de F ; n = o tamanho da amostra, y o número de sucessos ($y = 1, 2, \dots, n-1$), ou seja, o número de notas observadas em cada tempo de imersão e leitura, $2y$, $2(n - y + 1)$, $2(y + 1)$ e $2(n - y)$ = os graus de liberdade das distribuições de F . O intervalo de confiança foi calculado para cada tempo de imersão (10 e 20 minutos) e nos dois tempos de avaliação após imersão: 10 e 20 minutos.

De acordo com Leemis e Trivedi (1996), nos casos especiais em que $y = 0$ e $y = n$, deve-se proceder da seguinte forma:

Se $y = 0$, o *LI* do *IC* é tomado como 0 e o *LS* é obtido como anteriormente.

Se $y = n$, o *LS* do *IC* é tomado como 1 e o *LI* é obtido como anteriormente.

2.2.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Levene (Homogeneidade) e Shapiro Wilk (Normalidade) no estudo da variabilidade dos dados, utilizando o programa estatístico SPSS (NIE, 1975). Após esta análise, os dados foram submetidos à Teoria da Estimação, para um Intervalo de Confiança (IC), exato para Proporção (P), utilizando a distribuição de F, verificando a existência de diferenças entre, os tempos de imersão e secagem por meio da sobreposição ou não dos intervalos de confiança, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008). Sendo assim, a interpretação do teste segue da seguinte forma: havendo sobreposição de um intervalo inteiro, ou apenas parte dele, ocorre interação significativa; não havendo sobreposição de intervalos, não existe interação entre os fatores estudados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração de percloroeto de ferro para indicação de *Pectobacterium* spp. em tubérculos de batata

Baseado nas observações, foi verificado que o melhor tempo de avaliação ocorreu com 20 minutos de secagem dos tubérculos na solução de percloroeto de ferro, sendo este o escolhido para avaliar o surgimento de sinais (Tabela 1).

A concentração percloroeto de ferro a 21% com tubérculos imersos por 10 e 20 minutos, após 20 minutos de secagem, apresentou bons resultados quanto à observação de sinais nítidos na indicação de danos, uma vez que o percloroeto de ferro em solução aquosa é capaz de reagir com o oxigênio do ambiente, liberando moléculas de oxigênio e cloro e promovendo o escurecimento nas áreas lesionadas.

O mesmo parece ocorrer nos testes realizados na França, como meio de indicar a presença ou não de danos mecânicos em lotes de batatas. Por isso, por questões de viabilidade e economia de tempo para a execução do teste nas lavadoras, seria mais adequada a imersão dos tubérculos por apenas 10 minutos (Tabela 1).

TABELA 1. Tempo de imersão de tubérculos de batata cv. Ágata, em diferentes concentrações de percloroeto de ferro, com 20 minutos de avaliação. Uberlândia-MG, 2009.

Tratamentos	Tempo de imersão (minutos)		
	10	20	30
Testemunha-seca	A	A	A
Percloroeto de ferro 0,0 %	A	A	A
Percloroeto de ferro 8,4%	B	B	C
Percloroeto de ferro 21,0%	C	C	C
Percloroeto de ferro 42,0%	C	C	C

(A) Ausência de sinais, (B) presença de sinais leve e (C) presença de sinais nítido.

3.2 Determinação da escala de notas para indicação de *Pectobacterium* spp. em tubérculos de batata.

Comparando os intervalos de confiança dentro da escala de notas, para o período de imersão de 10 minutos, apenas as notas 2- manchas escuras com LI(2)= 16 e LS(3)= 68 em 10 minutos de secagem e LI(2)= 4 e LS(3)= 48 em 20 minutos de secagem, e nota 3- manchas escuras entre as lenticelas com LI(2) 0 e LS(3) 21 em 10 minutos de secagem e LI(2) 4 e LS(3) 48 em 20 minutos foram significativos, com intervalos de confiança que foram sobrepostos em relação as demais notas nos 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 21% (Tabela 2 e Anexo A2).

Com relação aos 20 minutos de imersão, apenas a nota 3- manchas escuras entre as lenticelas apresentou interseção entre os intervalos de confiança com LI(2)= 2 e LS(3)= 40 para 10 minutos de secagem e LI(2)= 4 e LS(3)= 48 para 20 minutos de secagem (Tabela 2 e Anexo A2).

TABELA 2. Estimação intervalar para o parâmetro nota em tempos de imersão nas soluções de percloroeto de ferro, avaliadas em dois tempos distintos. Uberlândia – MG, 2009.

Tabela 1 - 2024							
Tempo de secagem (minutos)	Escala de Notas	Tempo imersão (minutos)					
		Prop (1)	10		Prop (1)	20	
			95% de confiança			95% de confiança	
			LI(2)	LS(3)		LI(2)	LS(3)
10	0	40	16	68	40	16	68
	1	20	4	46	20	4	48
	2	40	16	68	20	4	48
	3	0	0	21	13	2	40
	4	0	0	21	0	0	21
20	0	40	16	68	40	16	68
	1	20	4	48	20	4	48
	2	20	4	48	20	4	48
	3	20	4	48	20	4	48
	4	0	0	21	0	0	21

⁽¹⁾ Prop: estimativa pontual da proporção de tempos de leitura; ⁽²⁾ LI: Limite inferior do intervalo de confiança para proporção de tempo de leitura; ⁽³⁾ LS: Limite superior do intervalo de confiança para proporção de tempo de leitura. (Levene) **F= 1,171** (,364) e (Shapiro Wilk) **W= 0,943** (,113), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Dessa forma, devido a capacidade da nota 3 qualificar os tubérculos tanto em 10 minutos, quanto em 20 minutos de secagem e imersão na solução, a mesma foi escolhida para qualificá-los quanto aos danos em 10 minutos de imersão; devido a economia de tempo na realização do teste. Outro fator que justifica esta escolha é o fato das lesões ficarem mais visíveis do que na nota 2- manchas escuras médias, já que elas também mostram ser indicativas de danos para 10 minutos de imersão. Com isso, sugere-se o uso de 20 minutos de secagem para avaliar o surgimento de manchas, qualificando os tubérculos conforme os resultados encontrados no experimento 3.1.

Como os resultados encontrados atenderam as expectativas, baseados em informações de testes realizados na França (informação verbal)⁴, foi determinado o tempo de imersão dos tubérculos de 10 minutos e as avaliações realizadas com 20 minutos de secagem após a retirada da solução. A esta escolha deve-se a redução de tempo para avaliação dos testes, já que a sugestão é que eles sejam implantados nas lavadoras para facilitar a logística da mercadoria, portanto, não sendo possível a realização de testes morosos aliados à justificativa de se ter testes com níveis confiáveis de leitura.

Na França (informação verbal)⁴, amostras de tubérculos de batatas recém colhidos, quando vão para o beneficiamento e lavadoras, passam por um teste rápido de imersão em baldes contendo solução de percloroeto de ferro (8%) por um determinado tempo desconhecido, que reporta a informação do estado sanitário e qualidade dos lotes. Assim, de acordo o resultado dos testes realizados para cada amostra de lotes, eles são destinados ao armazenamento ou ao mercado local mais próximo, evitando assim, perdas por contaminação por *Pectobacterium* spp., uma vez que danos presentes nos tubérculos podem levar a esta contaminação e consequente perda de lotes.

As *Pectobacterium* spp. são fisiologicamente bactérias anaeróbias facultativas, assim, caso haja a disponibilidade de oxigênio no ambiente, elas farão a respiração e, na falta dele, serão fermentativas. Desta forma, quando o percloroeto de ferro entra em contato com o a água, ele reage liberando moléculas de oxigênio ao ambiente, se neste momento há a presença destas bactérias, elas irão metabolizar esse oxigênio, consumindo-os na respiração. Talvez isto explique o fato do surgimento de manchas escuras nos tubérculos de batata. Sugerindo a hipótese de que se os tubérculos estiverem contaminados por este tipo de bactéria, possivelmente na presença de percloroeto de

⁴ Informação fornecida pela Associação Brasileira da Batata (ABBA) em 2009.

ferro, haverá o consumo do oxigênio liberado por ele, uma vez que ele é considerado um composto altamente oxidativo (LOGAN, 1998), ocasionando, portanto, o escurecimento nestas regiões no contato entre os dois.

Logan e La Point (2002) reforçaram esta hipótese de aproveitamento do oxigênio liberado pelo percloro de ferro pelas bactérias anaeróbias facultativas como as *P. carotovorum*, pois assim como o perclorato, ele é reduzido, chegando num produto final de cloro (CL⁻) e oxigênio, onde alguns isolados bacterianos usam o oxigênio para sua respiração celular em condições anóxicas.

Segundo os autores Achenbach e outros (2001) e Coates e colaboradores (1999), estes organismos que fazem a redução do percloro são filogeneticamente diferentes, com representantes nas sub-classes α -, β -, γ -, e δ do Proteobacteria, com maioria presente na sub-classe β , sendo membros do gênero *Dechloromonas* ou *Dechlorosoma*; e como as *Pectobacterium* spp. fazem parte da sub-classe gama, os resultados encontrados concordam com o grupo de bactérias dos autores acima citados.

4 CONCLUSÕES

Tubérculos de batata imersos por 10 minutos na solução de percloroato de ferro a 21%, e avaliados 20 minutos após secagem, podem indicar o estado físico nos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, L. A.; et al. *Dechloromonas agitata* N.N. gen., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* N.N. gen., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v. 51, p. 527–533, 2001.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; SPOTO, M. H. F. Estádios de maturação e qualidade pós-colheita de goiabas ‘Pedro Sato’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 29-31, 2004.
- COATES, J, D., et al. Ubiquity and diversity of dissimilatory (Per)chlorate-reducing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5234–5241, 1999.
- DURIGAN, M. F. B.; et al. Injúrias mecânicas na qualidade pós colheita de lima ácida ‘Tahiti’ armazenada sob condição ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 369-372, 2005.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- LEEMIS, L.M.; TRIVEDI, K.S. A comparison of approximate interval estimators for the bernoulli parameter. **The American Statistician**, Alexandria, v. 50, n. 1, p. 63-68, Feb.1996.
- LOGAN, B. E. A review of chlorate- and perchlorate- respiring microorganisms. **Bioremediat Journal**, v. 2, p. 69-79, 1998.
- LOGAN, B.E.; LAPOINT, D. Treatment of perchlorate- and nitrate-contaminated groundwater in an autotrophic, gas phase, packed-bed bioreactor. **Water Research**, New York, v. 36, p. 3647–3653, 2002.
- MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. R. Qualificação de doenças em planta. In: _____. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa, 2007. Cap. 7, p. 161-169.
- OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER JR, W. T. Use of starch and potato peel waste for perchlorate bioreduction in water. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 347, p. 35– 45, 2005.
- PATARO, L. L.; SILVEIRA JÚNIOR, V. Relação entre o período de pós-colheita e a vida de prateleira no resfriamento de rúcula. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.6, n.2, p.157-164, 2004.
- PERYAM, D. R.; GIRARDOT, N. Advanced taste-tes method. **Food Engineering**, New York, v.24, n.7, p. 58-61, 194, 1952.

CAPÍTULO 3

RESUMO

Caracterização bioquímica, fisiológica e molecular de isolados de *Pectobacterium* spp.

O isolamento, a detecção e a identificação bioquímica e molecular de fitobactérias fazem parte de um processo de análises importantes na caracterização dos fitopatógenos causadores de doenças no Brasil e no mundo. O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e avaliar bioquimicamente, fisiologicamente e molecularmente os isolados de *Pectobacterium* spp. provenientes das amostras de lotes do capítulo 2 e de isolados da coleção da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Ensaio foram realizados no laboratório de Virologia Vegetal do ICIAG da UFU, entre os anos de 2009 e 2011. Para o isolamento, foram utilizadas iscas de batatas saudáveis, encostando a ponta do estilete no período de transição da doença entre a parte sintomática e a saudável para purificar e preservar as pectobactérias encontradas. Foram feitos vários testes fisiológicos e bioquímicos, como: fermentação de glicose, Gram, catalase, oxidase, crescimento à 37°C, redução de substâncias a partir de sacarose, atividade da fosfatase, produção de indol e produção de ácido a partir de sorbitol, melibiose, citrato e lactose. Para identificação dos isolados em nível de subespécie, foi feita a PCR, utilizando os primers EXPCCR/EXPCCF, que diferenciam para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), ECA1f/ECA2r diferenciando para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca), L1RA/11RG/Br1f, que diferenciam *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) de algumas estirpes de Pcc, e 1491f, que diferencia Pcc de *Dickeya chrysanthemi*. Assim, os isolados estudados foram caracterizados como pertencentes ao gênero das *Pectobacterium*, não se enquadrando na classificação bioquímica para diferenciação das subespécies e identificados molecularmente como possíveis *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* e *Dickeya chrysanthemi*.

Palavras-chave: Bactéria, PCR, *Solanum tuberosum*.

ABSTRACT

Biochemical, physiological and molecular characterization of *Pectobacterium* spp. isolates

Isolation, detection, and biochemical and molecular identification of plant pathogenic bacterial are part of a process of important analyses for the characterization of disease causing plant pathogens in Brazil and in the world. This study isolated, identified and evaluated biochemically, physiologically, and molecularly isolates of *Pectobacterium* spp. from samples collected for the study in Chapter 2, and those from the collection of the Universidade Federal de Uberlândia (UFU). These analyses were done in the plant virus laboratory at the Universidade Federal de Uberlândia-MG, from 2009 to 2011. Isolation was done using healthy potato baits, touching the tip of a needle in the transition zone between the symptomatic and healthy part of the potato to purify and preserve the pectobacteria found. Several physiological and biochemical tests were done, such as: glucose fermentation, Gram, catalase, oxidase, growth at 37°C, reduction of substances from sucrose, phosphatase activity, indol production and acid production from sorbitol, melibiose, citrate and lactose. Identification of isolates at the subspecies level was done by PCR, using the primers EXPCCR/EXPCCF, which differentiate *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), ECA1f/ECA2r for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca), L1RA/I1RG/Br1f, for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr) from some strains of Pcc, and 1491f, which differentiates Pcc from *Dickeya chrysanthemi*. Therefore, the isolates studied were characterized as belonging to the genus *Pectobacterium*, did not fit in the classification biochemical for differentiation of subspecies and molecularly identified as possible *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* and *Dickeya chrysanthemi*.

Keywords: Bacteria, PCR, *Solanum tuberosum*.

1 INTRODUÇÃO

O isolamento, a detecção e a identificação de fitobactérias fazem parte de um processo de análises importantes na caracterização dos fitopatógenos causadores de doenças, para isso faz-se necessário o uso de meios de cultura seletivos, testes bioquímicos, fisiológicos e molecular, sendo este, ferramenta indispensável devido suas contribuições no estudo e entendimento para uma melhor identificação.

De acordo com Cuppels e Kelman (1974), são utilizados, já há muito tempo no isolamento, identificação e detecção de *pectobactérias*, vários meios seletivos contendo pectina ou polipectato de sódio apresentando diferentes graus de sucesso em batatas.

Dentre os meios utilizados, o CVP (cristal- violeta- pectato) é o mais importante no isolamento de *pectobactérias*. Sua seletividade baseia-se na habilidade do patógeno em hidrolisar o polipectato e formar cavidades típicas na superfície do meio de cultura, característica altamente dependente do tipo de polipectato usado. No entanto, o polipectato de sódio, com nome comercial de Sunkist, tornou-se indisponível comercialmente (CUPPELS; KELMAN, 1974). Como meio alternativo, têm-se a utilização do fruto de pimentão verde como meio parcialmente seletivo utilizado no isolamento de *pectobactérias* de vários hospedeiros, apresentando alta seletividade (TAKATSU et al., 1981).

Os testes bioquímicos tradicionais são utilizados como uma ferramenta auxiliar na classificação taxonômica. A estes testes, tem sido adicionada a taxonomia polifásica, valendo-se tanto de parâmetros fisiológicos, como genéticos. O surgimento da biologia molecular munida da PCR é considerado importante suporte, facilitando a análise genômica e melhorando a capacidade de caracterização e classificação de estirpes e os estudos envolvendo a diversidade genética de populações (SCHLOTER et al., 2000).

Baseada na amplificação *in vitro* do DNA, a PCR é direcionada por dois oligonucleotídeos iniciadores, baseados numa sequência específica, resultando na síntese de milhares de cópias de DNA em poucas horas de detecção de diversos microorganismos (MULLINS; FALOONA, 1987), uma vez que ela apresenta alta sensibilidade e especificidade nos resultados obtidos, sendo nos dias atuais amplamente utilizada na busca de resultados mais precisos.

Contudo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquímica, fisiológica e molecularmente, isolados de *Pectobacterium* spp. provenientes de diferentes locais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados durante os anos de 2009 e 2011 no Laboratório de Virologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias da UFU.

2.1 Origem e manutenção dos isolados

A descrição dos isolados bacterianos usados neste estudo encontra-se na Tabela 3. Foram usados isolados de *Pectobacterium* provenientes de alface, mandioca e tomate e tubérculos de batata.

TABELA 3. Isolados de *Pectobacterium* spp. de diferentes locais e hospedeiros, Uberlândia-MG, 2009.

Isolado	Hospedeiro	Procedência	Isolamento
UFU A6	batata	Uberlândia, MG	tubérculo
UFU A7	alface	Fazenda do Glória Uberlândia, MG	folha
UFU A9	batata	Santa Juliana, MG	tubérculo
UFU A14	batata	Uberlândia, MG	tubérculo
UFU A20	batata	Santa Juliana, MG	tubérculo
UFU A22	batata	Uberlândia, MG	tubérculo
UFU A27	mandioca	Ipiacu, MG	raíz
UFU A33	alface	Fazenda do Glória Uberlândia, MG	folha
UFU A37	tomate	Uberlândia, MG	fruto
UFU A47	batata	Santa Juliana, MG	tubérculo

Os isolados bacterianos foram rotineiramente cultivados em meio de cultura 523 de Kado; Heskett (1970) a 28 °C por 48 h. Todos os isolados foram preservados por dessecação em papel de filtro e em suspensão em água estéril, e mantidos em coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do ICIAG/UFU.

Foram retiradas amostras aleatórias de tubérculos visivelmente contaminados por *pectobactérias* presentes nos sacos de 50 kg utilizados no primeiro experimento, provenientes do Centro Estadual de Abastecimento (Ceasa Uberlândia-MG), originadas de diversas regiões produtoras, no período de março a abril de 2009.

O isolamento da bactéria foi feito usando iscas biológicas em tubérculos de batata, incubados à 28°C, por 24 horas. Em seguida, foi feito o reisolamento das mesmas em meio 523 e incubadas a 28°C, por 24 horas.

Depois de purificadas, as bactérias elas foram submetidas à testes preliminares para identificação de seus gêneros, baseados nas características culturais das colônias, na cor, teste de gram, utilizando o KOH à 3%, teste de fermentação de glicose (Oxidação/Fermentação), teste de hipersensibilidade em fumo e de patogenicidade com isca de batata, auxiliados por um microscópio estereoscópico com iluminação oblíqua. Após observadas e caracterizadas estas propriedades, elas foram preservadas em água e em tiras de papel, ficando armazenadas em refrigerador à 8°C.

2.2 Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados

A caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados descritos na Tabela 2 foi feita usando os seguintes testes: fermentação de glicose (oxidação/fermentação), gram, catalase, oxidase, crescimento à 37°C, redução de substâncias a partir de sacarose, atividade da fosfatase, produção de indol e produção de ácido a partir de sorbitol, melibiose, citrato e lactose (SCHAAD et al., 2001).

2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) dos isolados bacterianos

A extração do DNA dos isolados foi realizada de acordo com o protocolo de Sambrook et al., (1989). Após a PCR, a identificação foi feita seguindo a chave dicotômica (Anexo A3). Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: ECA1f (5' – GAA CTT CGC ACC GCC GAC CTT CTA – 3') ECA2r (5' – GCA CAC TTC ATC CAG CGA – 3') (DE BOER; WARD, 1995) que identifica *P.carotovorum* subsp. *atrosepticum*; foram desnaturados inicialmente a 94°C e por 5 min, seguido por 25 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 45 s, 72°C, por 45 s e uma extensão final 72°C, por 5 min. EXPCCR (5' – GCC GTA ATT GCC TAC CTG CTT AAG – 3') EXPCCF (5' – CGC CAT CAT AAA AAC AGC – 3') (KANG et al., 2003) identifica *P.*

carotovorum subsp. *carotovorum* ou *P. Wansii* (fragmento de 550 pb) e exclui *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*. Seu ciclo de reação foi desnaturação inicial a 94°C, por 4 min, seguido por 30 ciclos de 94°C, por 1 min, 60°C, por 1 min, 72°C, por 2 min e uma extensão final 72°C por, 10 min.

A tríade de primers: 1491f (5' – GAA GTC GTA ACA AGG TA – 3'), L1RA (5' – CAA GGC ATC CAC CGT – 3'), L1RG (5' – CAG GGC ATC CAC CGT – 3') (FESSEHAIE et al., 2002) que diferencia *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (fragmentos de 510 e 550 pb) de *Dickeya chrysantemi* (fragmentos de 480pb, 510 e 550pb); foram desnaturados inicialmente a 94°C, por 2 min, seguido por 30 ciclos de 94°C, por 45 s, 66°C, por 45 s, 72°C, por 90 s e uma extensão final 72°C, por 10 min.

Para a tríade de primers: Br1f (5' – GCG TGC CGG GTT TAT GAC CT – 3')/L1RA (5' – CAA GGC ATC CAC CGT - 3')/L1RG (5' – CAG GGC ATC CAC CGT – 3') (DUARTE et al., 2004) que diferencia *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, produzindo um fragmento de 322pb, desnaturados inicialmente a 94°C, por 2 min, seguido por 30 ciclos de 94°C, por 45 s, 66°C, por 45 s, 72°C, por 90 s e uma extensão final 72°C, por 10 min.

Para todos os primers, as reações de amplificação realizadas foram em um volume final de 50 µL, contendo, Taq Buffer Invitrogen 1X, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 100 ng de cada primer, 2.5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5U/µL) e 100 ng de DNA, utilizando termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram carregados em gel de agarose 1.5% (wt/v) com 0.20 µg/100 mL de brometo de etídio e eletroforado a 100V, por 40 min, e fotografados através do sistema de análise de gel computadorizado (Kodak Digital Science 1D).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento da bactéria

Todos os isolados foram caracterizados com forma circular, bordos lisos, convexos, com diâmetro variando de 1 a 3 milímetros, textura lisa, aparência brilhante, uma propriedade óptica opaca, de cor creme palha, Gram negativos e fermentativos (Tabela 4). Por estas características, foram identificados como *Pectobacterium* spp. Estes resultados são característicos para isolados de pectobactérias, concordando com De Boer e Kelman (2001).

Foi verificada a incidência da podridão-mole associada à bactérias pectolíticas em todas as amostras avaliadas, independente da cultura e da região. Este fato reforça a presença de isolados de *Pectobacterium* spp. em diversos ambientes e utilizando várias plantas como hospedeiras.

O mesmo foi encontrado por Alvarado (2006), trabalhando com variabilidade e ecologia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* como agentes da podridão mole em couve-chinesa; e para Ravari e outros (2011), que por meio do isolamento identificaram que todos os isolados de amostras de tubérculos armazenados e plantas ornamentais em casas de vegetação estudados no nordeste do Irã pertenciam ao gênero das *Pectobacterium* spp.

Com base nos testes Gram, oxidação/fermentação, capacidade de formar cavidade no meio crital viloeta (CVP), os autores Merwe e colaboradores (2010) chegaram à conclusão, não só em nível de gênero e espécie, mas também de subespécie por meio de PCR, de que seus isolados tratavam-se de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Hu e colaboradores (2008), no estudo da podridão mole causando grandes perdas de rendimento em *Pinellia ternata* (Araceae), uma planta medicinal que cresce na parte oriental da Ásia, principalmente na China, verificaram que os isolados causadores da doença, através da patogenicidade e características fenotípicas e filogenéticas, tratavam-se de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Os resultados encontrados somados aos já obtidos por vários autores comprovam que o isolamento e a identificação de fitobactérias fazem parte de um processo de análises importantes para sua caracterização inicial.

3.2 Caracterização bioquímica e fisiológica dos isolados

Todos os isolados avaliados não se enquadraram na classificação bioquímica para sua diferenciação em subespécie (Tabela 4).

Os isolados UFU A6 e UFU A47 apresentaram a produção de ácido a partir de citrato negativo, não podendo ser identificados *P.carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Os isolados UFU A7 e UFU A20 apresentaram a redução de substâncias a partir de sacarose negativo, e o isolado UFU A20 apresentou também atividade da fosfatase positiva, não podendo ser identificados como *P.carotovorum* subsp. *odoriferum*.

O isolado UFU A14 apresentou produção de ácido a partir de melibiose positiva, não podendo ser identificados como *P.carotovorum* subsp. *betavascularum* e também não podendo ser identificados como *P.carotovorum* subsp. *brasiliensis*, devido a produção de ácido a partir de citrato negativo.

Para os isolados UFU A9, UFU A22, UFU A27, UFU A33 e UFU A37, devido à diversidade do resultado dos testes bioquímicos, os mesmos não puderam ser identificados em subespécie.

Alvarado (2006), na identificação ao nível de espécie e subespécie de seus isolados, concluiu que todos se enquadraram como *P.carotovorum* subsp. *carotovorum*, uma vez que cresceram a 37 °C, não produziram ácido a partir de sorbitol, produziram ácido a partir de lactose, não apresentaram atividade de fosfatase, com relação a redução de sacarose e 10,2% dos isolados apresentaram esta característica. O contrário foi observado neste trabalho, em que a maioria dos isolados não apresentaram resposta para ele, e 12,8% não foram capazes de produzir ácido a partir de melibiose, enquanto 100% dos isolados do presente estudo apresentaram resposta positiva para este teste.

Estes resultados vão de encontro à grande diversidade que ocorre entre as espécies de *P.carotovorum*, tornando difícil a identificação apenas com base bioquímica e fisiológica. A presença dos isolados com características intermediárias, inviabilizando a sua caracterização exata, corroboram com os autores Palma (2006), Stanghellini e Meneley (1975), Jabuonski e colaboradores (1986) e Oliveira e outros (2003) que relataram a dificuldade de identificação e correta classificação destas bactérias. E ainda, a identificação fenotípica de bactérias que, além de consumir muito tempo, pode ser imprecisa (TOTH et al.,2001), no caso das *Pectobacterium* ocorre devido a sua grande diversidade genética e fenotípica dentro das espécies (SEO et al., 2000; SEO; TAKANAMI, 2002), dificultando a identificação.

TABELA 4. Características fenotípicas dos isolados bacterianos, Uberlândia-MG, 2011.

Controle/subespécies	Reação de Hipersensibilidade	Patogenicidade:	O/F	Gram	Catalase	Oxidase	Crescimento á 37°C	Red. Subst. a partir de sacarose	Atividade Fosfatase	Produção de Indol	Produção de ácido a partir:				Conclusão
											Sorbitol	Melibiose	Citrato	Lactose	
	Fumo	Batata													
Pcc	+	+	F	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Pca	+	+	F	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>
Dch	+	+	F	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Dickeya chrysanthemi</i>
Pcbr	+	+	F	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>
Pco	+	+	F	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>
Pcb	+	+	F	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>betavasculorum</i>
Isolados															
UFU A6	+	+	F	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A7	+	+	F	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A9	+	+	F	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A14	+	+	F	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A20	+	+	F	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A22	+	+	F	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A27	+	+	F	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A33	+	+	F	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A37	+	+	F	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	Não enquadra nas características bioquímicas
UFU A47	+	+	F	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	Não enquadra nas características bioquímicas

Teste de patogenicidade, fermentação de glicose: oxidação/fermentação (O/F); Teste de Gram; Teste da catalase; Teste da Oxidase; Teste Crescimento à 37°C; Teste Redução de substâncias a partir de sacarose, Teste Atividade da fosfatase; Teste da Produção de Indol; Teste da Produção de Ácidos a partir de: Sorbitol, Melibiose, Citrato e Lactose. Pcc = *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pca = *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Dch = *Dickeya chrysanthemi*; Pcbr = *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; Pco = *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*; Pcb = *P. carotovorum* subsp. *betavascolorum*.

Alvarado (2006) verificou elevada variabilidade entre os isolados de *P.carotovorum* subsp. *carotovorum* na identificação de pectobactérias causadoras da podridão-mole em couve-chinesa; apontando a necessidade de uma maior atenção em estudos de identificação, detecção, epidemiologia e controle da doença. Resultados semelhantes foram encontrados por Ravari e outros (2011), onde a maioria de seus isolados foram determinados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Seo e Takanami (2002) também não conseguiram resultados confiáveis e seguros em testes bioquímicos para a identificação dos isolados bacterianos, embora fosse para o crescimento a 37°C e a redução da sacarose para diferenciar *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*. Sendo assim, outros métodos devem ser utilizados para confirmar a identificação da subespécie (YAP et al., 2004).

Não foram identificados isolados com características de *Dickeya chrysanthemi* e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* entre os estudados. Ao contrário de Palma (2006), que confirmou a presença de uma *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* e cinco como *Dickeya chrysanthemi* isolados de batatas baseados em características fenotípicas e genotípicas; de Slawiak e outros (2009), que detectaram a presença de *Dickeya chrysanthemi* em isolados de batata na Europa, e de Ravari e outros (2011), que identificaram cinco estirpes de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* em batatas no norte do Irã. Na prática, *Dickeya chrysanthemi* tem sido diferenciada das pectobactérias baseado na produção de indol, atividade da fosfatase (SAMSON et al., 2001), conforme encontrado no estudo proposto, e também quanto a sensibilidade a eritromicina.

Dentre os isolados estudados, o único que apresentou características para duas subespécies simultaneamente foi o UFU A14 (Tabela 4), podendo ser *P.carotovorum* subsp. *brasiliensis* ou *P.carotovorum* subsp. *Betavascularum*, de acordo com os resultados para produção de ácido a partir de melibiose e citrato, positivo e negativo, respectivamente. Embora as estirpes de *P.carotovorum* subsp. *betavascularum* estejam associadas à podridão mole em beterraba-açucareira (THOMSON et al., 1981), elas também podem ser encontradas em batata (SAMSON et al., 1989), podendo justificar a possibilidade seu surgimento neste estudo.

Merwe e colaboradores (2010) detectaram isolados representativos de *P.carotovorum* subsp. *brasiliensis*, nos testes bioquímicos utilizando colônias únicas de seus isolados extraídos de batatas no sul da África.

No estudo da ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente, os autores El Tassa e Duarte (2004) identificaram, por meio de testes bioquímicos, 119 isolados sendo identificados como *P.carotovorum* subsp. *brasiliensis* e 96 como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e oito que não corresponderam a nenhuma espécie ou subespécie, não sendo possível, portanto, identificá-los.

Duarte e colaboradores (2004), na determinação de características fisiológicas e bioquímicas da bactéria associada a doenças como canela preta e podridão-mole de batatas no Brasil, comparando as espécies e subespécies, propuseram, com base nos resultados encontrados, principalmente na diferença encontrada quanto ao crescimento à 37°C de isolados de região de temperaturas climáticas frias característicos para presença de *P.carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca), que se tratava de outro isolado, visto que esta não é uma característica compreendida a esta pectobactéria. Ainda, este fato reforça a ideia da formação de colônias típicas de Pca, as quais reduzem substâncias a partir de açúcares, utilizavam o α -metil glucosídeo e possuíam atividade da fosfatase, para estes outros isolados, chamando a atenção dos pesquisadores de que não se tratava de Pca, mas sim de uma nova subespécie, a qual denominaram de *P.carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Este relato soma a ideia de que a existência de isolados que não se enquadram dentro das caracterizações de subespécies, levando a crer que as identificações anteriores não levaram em conta a grande homogeneidade genética, bioquímica e fisiológica destas estirpes, o que culminou nesta nova subespécie.

O mesmo pode ter ocorrido para os isolados pesquisados, os quais não tiveram enquadramento adequado para nenhuma subespécie proposta, sugerindo que a grande diversidade geográfica, genética, fenotípica e de fatores agindo na evolução das espécies favorecem o surgimento de novas subespécies, dificultando a identificação. Assim, é necessário o estudo contínuo na caracterização destes novos organismos no melhor entendimento e controle de doenças que possuem importância considerável na área agrônoma.

3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) dos isolados bacterianos

O DNA não foi amplificado na reação, portanto, não gerou fragmentos que identificam *P.carotovorum* subsp. *atrosepticum* (690pb). O mesmo ocorreu para o par EXPCCR/EXPCCF, que não amplificou para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (550pb) ou *P. carotovorum* subsp. *wansii* (550pb), excluindo *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*.

O gel para as tríades de primers 1491f/L1RA/L1RG apresentou a seguinte sequência de aplicação de amostras: MARCADOR DNA LADDER 100pb e isolados: UFU A6, UFU A7, UFU A9, UFU A14, UFU A20, UFU A22, UFU A27, UFU A33, UFU A37 e UFU A47 (Figura 1).

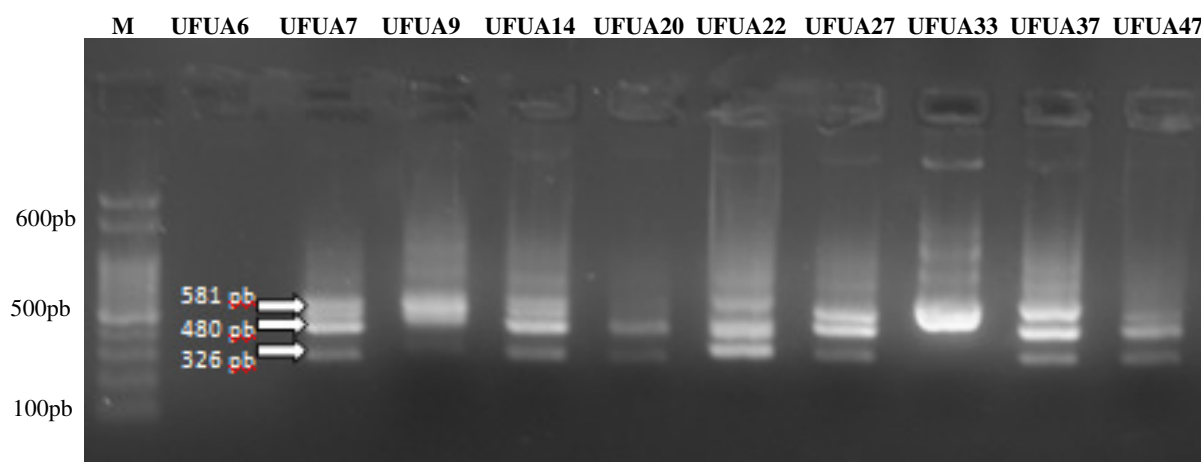


FIGURA 1. Amplificações de fragmentos de DNA para 10 isolados bacterianos (UFU A6, UFU A7, UFU A9, UFU A14, UFU A20, UFU A22, UFU A27, UFU A33, UFU A37, UFU A47) com a tríade de primers 1491f/L1RA/L1RG, Uberlândia-MG, 2011.

A tríade de primers 1491f/ L1RG/ L1RA gera fragmentos de DNA de 510pb e 550pb, os quais diferenciam *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* de *Dikeya chrysanthemi* com fragmentos de 480pb, 510pb, 550pb. No presente estudo, a tríade amplificou fragmentos de DNA dos isolados UFU A7, UFU A14, UFU A22, UFU A27, UFU A37 e UFU A47, gerando fragmentos de 326 pb, 480 pb e 581 pb (Figura 1). Devido as proximidades dos fragmentos encontrados e baseado na árvore decisória de identificação das subespécies de *Pectobacterium* spp (Anexo A3), aparentemente os isolados poderiam ser *Dikeya chrysanthemi*, porém a presença de uma banda contendo o fragmento de 326pb torna o resultado impreciso, sugerindo inclusive que possa ser uma nova subespécie.

A amplificação para os fragmentos de 480pb e 581pb não ocorreu para 326pb do isolado UFU A9 (Figura 1). Essas amplificações podem ser consideradas próximas das que poderiam indicar *Dikeya chrysanthemi* (480, 510 e 550pb), assim como para: UFU A7, UFU A14, UFU A22, UFU A27, UFU A37 e UFU A47, no entanto, a falta de um terceiro fragmento (326pb) remete a idéia de que se trata de uma nova subespécie. O mesmo ocorreu para o isolado UFU A20, embora ausente uma banda de 581pb.

O isolado UFU A6 (Figura 1) foi o único que a PCR não conseguiu amplificar seu DNA. Talvez por se tratar de uma nova espécie/subespécie ou mesmo devido à falta de primers mais específicos capazes de amplificá-lo.

Já a tríade de primers de Br1f/L1RG/L1RA, gera fragmentos de DNA de 510pb e 550pb, os quais diferenciam *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* com fragmentos de 320pb, 510pb, 550pb. No entanto, os primers detectaram bandas com fragmentos de 352 pb, 420 pb e 690 pb (Figura 2), amplificando apenas para o isolado UFU A33. Com isso, sugere-se que ele seja um representante de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, baseado na aproximação dos fragmentos e na árvore decisória de identificação das subespécies de *Pectobacterium* spp. (Anexo A3). Embora a presença de uma banda contendo um fragmento de 690pb torna o resultado impreciso, sugerindo inclusive que possa ser uma nova espécie/subespécie ou mesmo uma variação da própria *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

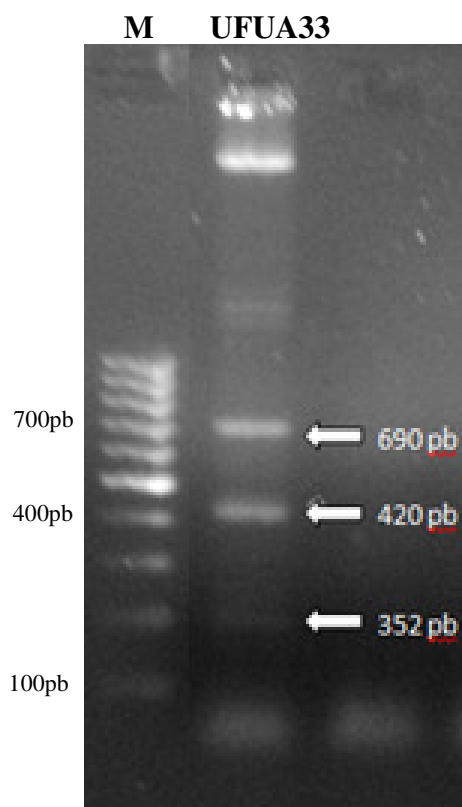


FIGURA 2. Amplificações de fragmentos de DNA para o isolado UFU A33, com a tríade de primers Br1f/L1RA/L1RG, Uberlândia-MG, 2011.

A análise com base na PCR não confirmou a identificação dos isolados caracterizados bioquimicamente, reforçando a hipótese de que os mesmos podem mesmo ser de outras espécies/subespécies, ou que os primers não foram capazes de detectar os fragmentos.

Contrário aos resultados obtidos neste trabalho e de acordo com Duarte e colaboradores (2003), todas as subespécies para *P. carotovorum* puderam ser diferenciadas pelo comprimento do fragmento de polimorfismos na região IGS pela enzima de restrição apropriada.

Hu e outros (2008), na caracterização de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* que causam apodrecimento em *Pinelli ternata*, uma erva medicinal muito utilizada na China, encontraram dois isolados que aparentemente se tratavam de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. carotovorum* subsp. *Odoriferum*, compartilhando de 97-99% de similaridade. Após estudos mais apurados, concluíram que os isolados em questão causando a podridão tratavam-se mesmo era de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Para os mesmos autores, as diferenças entre os dois isolados e outras *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* da Europa e aqui da América estão relacionadas à distribuição

geográfica ou diversidade de plantas hospedeiras. Pode se dizer que o mesmo ocorreu para os isolados identificados bioquimicamente, possivelmente como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* e *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, passando a ser identificadas como *Dickeya chrysanthemi* e *P. carotovorum* subsp. *Brasiliensis*, de acordo com o teste molecular.

Utilizando os mesmos primers na identificação de isolados associados ao apodrecimento e surtos de canela-preta de batatas no Sul da África, os autores Van der Merwe e outros (2010) detectaram a presença de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* por meio dos oligonucleotídeos BR1f e L1r, representando 77% dos isolados causadores das doenças. No trabalho proposto, apenas um isolado (UFU A33), representando 10%, foi considerado como um possível representante desta pectobactéria.

Assim como neste trabalho, a utilização de oligonucleotídeos iniciadores para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e *P. carotovorum* subsp. *Atrosepticum*, pelos autores El Tassa e Duarte (2004), confirmaram a identidade das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e a ausência de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*.

Gallois e colaboradores (1992) relataram que *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* não está associada à batata. O mesmo ocorreu neste trabalho, segundo os resultados moleculares para esta bactéria, uma vez que ela não foi detectada. Mas Seo e outros (2004) analisaram isolados de *P. carotovorum* provenientes de batata e de couve-chinesa, utilizando testes bioquímicos e análise das seqüências de rDNA 16S e IGS 16S-23S, e identificaram *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, ao contrário dos resultados aqui obtidos.

A possível presença de *Dickeya chrysanthemi* entre a maioria dos isolados identificados reforça a idéia de agentes causais da podridão-mole e canela-preta em batatas, podendo causar ainda podridão durante armazenamento, e como seu gênero é diversificado, pode afetar um elevado número de espécies de diferentes plantas, incluindo culturas economicamente importantes (SLAWIAK et al., 2009).

E ainda, a presença de *Dickeya chrysanthemi*, em grande número, talvez possa ser explicada pelo relato da ocorrência em beterraba de uma pectobactéria com características bioquímicas de *Dickeya chrysanthemi* e *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, originando a *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* (THOMSON et al., 1981), e com conteúdo de G+C intermediário entre *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Dickeya chrysanthemi*. Este relato reforça a idéia de que as formas intermediárias

possuem uma importância epidemiológica significativa e podem ser encontradas com maior frequência à medida que levantamentos mais amplos sejam efetuados (EL TASSA; DUARTE, 2004). Visto que a maioria dos isolados foram identificados como *D. chrysanthemi*, De Lindo e colaboradores (1978) afirmaram que batatas foram ocasionalmente infectadas por elas.

Com relação aos isolados pesquisados, em especial o UFU A6, que não tiveram uma definição exata quanto a sua identificação molecular bem como bioquímica, podemos atribuir o fato de que a diversidade entre as subespécies com perfis genéticos diferentes dificulta uma identificação exata. Em acordo, Palma (2006), selecionando oligonucleotídeos iniciadores e tentando compor um arranjo de sondas de DNA que identificasse estirpes de *pectobactérias*, obteve os mesmos resultados para alguns de seus isolados, chegando a mesma conclusão. Segundo Darrasse e colaboradores (1994); Waleron e outros (2002) e Yahiaoui-Zaid e outros (2003), diversos estudos têm mostrado que as *pectobactérias* são geneticamente distintas, formando grupos heterogêneos mesmo dentro das subespécies.

Sendo assim, o conhecimento da diversidade é um importante pré-requisito para o desenvolvimento de métodos para identificação e detecção das fitobactérias trabalhadas, bem como para classificação taxonômica, estudos epidemiológicos e desenvolvimento de estratégias para o controle da doença, principalmente no que diz respeito à seleção de genótipos e desenvolvimento de variedades resistentes em programas de melhoramento. Isto é particularmente importante quando diferentes espécies e subespécies, bastante relacionadas, causam doença no mesmo hospedeiro, como é o caso das *pectobactérias* em batata (EL TASSA; DUARTE, 2006).

4 CONCLUSÕES

Os isolados estudados foram caracterizados como pertencentes ao gênero das *Pectobacterium*, não se enquadrando na classificação bioquímica e molecular para diferenciação das subespécies.

REFERENCIAS

- ALVARADO, I. DEL CARMEN. M. **Variabilidade e ecologia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, agente da podridão-mole em couve chinesa.** 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área Fitopatologia)- Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2006.
- CUPPELS, D.A.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p.468-475, 1974.
- DARRASSE, A.: et al. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1437-1443, 1994.
- DE BOER, S.H.; KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**, St. Paul: APS Press, p. 56-72, 2001.
- DE BOER, S. H.; WARD, L. J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p.854-858, 1995.
- DE LINDO, L., FRENCH, E.R.; KELMAN, A. *Erwinia* spp. pathogenic to potato in Peru. **American Potato Journal**, Orono, v. 55, p.383, 1978.
- DUARTE, V.; et al. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 535-545, 2004.
- DUARTE, V. et al. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* subsp. nov. associated with blackleg of potato in Brazil. In: **Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology**, Christchurch, 2003, p.12.
- EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR-RFLP do gene *recA*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 023-028, 2006.
- EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 620-625, 2004.
- FESSEHAIE, A.; DE BOER, S.H.; LEVESQUE, C.A. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal Microbiology**, Montreal, v. 48, p.387-398, 2002.
- GALLOIS, A.; et al. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., associated with odorous soft rot of chicory (*Cichorium intybus* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v.42, p. 582- 588, 1992.

HU, X. F.; et al. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft-rot disease on *Pinellia ternata* in China. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, p. 305–310, 2008.

JABUONSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p. 185-195, 1986.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

MERWE, J. J. VAN DER.; et al. E. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 175–185, 2010.

MULLINS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, A. M. R.; et al. Incidence of pectolytic *Erwinia* associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 28, p.49-53, 2003.

PALMA, J. **Seleção de Oligonucleotídeos iniciadores visando compor um arranjo de sondas de DNA que identifique estirpes de pectobactérias**. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área Fitossanidade)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

RAVARI, S. B.; et al. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, p. 413–425, 2011.

SAMBROOK J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory**, p. 471, 1989.

SAMSON, R.; et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Inglaterra, v. 55, p. 1415–1427, 2005.

SAMSON, R.; et al. Six new species are delineated within *Erwinia chrysanthemi*. In: De Boer, S.H. (ed.). Plant Pathogenic Bacteria. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 10., 2001, Dordrecht. **Proceedings...** The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 150.

SAMSON, R.; NGWIRA, N.; RIVERA, N. Biochemical and serological diversity of *Erwinia chrysanthemi*. In: Clement, Z. (ed.). Plant Pathogenic Bacteria.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 7., 1989, Hungary. **Proceedings...** Budapest: Academia Kiado, 1989, p. 895-900.

SEO, S.T.; et al. Characterization of Korean *Erwinia carotovora* strains from potato and chinese cabbage. **Plant Pathology Journal**, Oxford, v.20, p. 283-288, 2004.

SEO, S.T.; TAKANAMI, Y. Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain on the basis of cellular fatty acid composition. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 46, p. 251-256, 2002.

SEO, S.T.; FURUYA, N.; TAKANAMI, Y. Genetic diversity in Thai strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* based on ERIC profiles and RFLP of *pel* gene. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 45, p. 15-19, 2000.

SCHAAD, N.W., JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**, 3.e. Saint Paul: APS Press 2001.

SCHLOTTER, M.; et al. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 647-660, 2000.

SLAWIAK, M.; et al. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 245–261, 2009.

STANGHELLINI, M.E.; MENELEY, J.C. Identification of soft rot *Erwinia* associated with blackleg in Arizona. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 86-87, 1975.

TAKATSU, A.; MELO, S.; GARCIA, E.J. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 550-551, 1981.

TOTH, I. K.; AVROVA, A. O.; HYMAN, L. J. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16s-23s intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4070- 4076, 2001.

THOMSON, S.V., HIDELBRAND, D.C.; SCHROTH, M.N. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.1037- 1042, 1981.

VAN DER MERWE, J. J.; et al. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 175-185, 2010.

WALERON, M.; et al. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. **Microbiology**, Washington, v. 148, n.2, p. 583-595, 2002.

YAHIAOUI-ZAIDI, R.; JOUAN, B.; ANDRIVON, D. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, n.1, p. 28-40, 2003.

YAP, M. N.; BARAK, J. D.; CHARKOWSKI, A. O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p. 3013-3023, 2004.

CAPÍTULO 4

RESUMO

Indicação de *Pectobacterium* spp. por percloroeto de ferro em tubérculos de batata inoculados

O percloroeto é um produto altamente oxidativo, por isso pode ser usado por alguns isolados de bactéria, sendo consumido por elas na respiração celular sob condições anóxicas. Assim, visando detectar a presença da *Pectobacterium* spp. inoculada em tubérculos de batata, mergulhados em solução de percloroeto de ferro à 21%, o trabalho foi instalado e conduzido no laboratório de Virologia Vegetal do ICIAG da Universidade Federal de Uberlândia-MG, entre os meses de agosto 2010 e março 2011. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas no espaço 5 x 4, sendo o primeiro fator relativo aos tempos de incubação e o segundo fator relativo a quatro tratamentos, com análise conjunta dos dados para as temperaturas. Foram utilizadas batatas-sementes das cultivares Ágata e Atlantic com o isolado UFU A14 de *Pectobacterium* spp., desta universidade, cuja suspensão bacteriana continha 10^{10} UFCs/ml ($OD_{550nm} = 0,5$). Os tubérculos de batata foram perfurados ou não com estilete, e mergulhados na suspensão bacteriana ou água. Em seguida, foram alocados em recipientes de plástico com o fundo coberto com papel germiteste levemente umedecido e fechados com sacolas plásticas e incubados a 22°C, 28°C e 35°C, por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram então imersas na solução de percloroeto de ferro na concentração de 21%, por 10 minutos, retirados e colocados sobre a bancada por um período de 20 minutos, sendo avaliado o diâmetro da lesão escurecida no local perfurado, com auxílio de uma régua. Pode-se concluir que o percloroeto de ferro foi capaz de sinalizar os danos físicos nos tubérculos de batata nos tratamentos perfurados, inoculados e não inoculados, e não a presença de *Pectobacterium* spp. A temperatura de 35°C foi mais eficiente na sinalização das injúrias.

Palavras-chave: Bactérias, Ágata, Atlantic, batata-semente.

ABSTRACT

Indication of *Pectobacterium* spp. by iron perchlorate in inoculated potato tubers

Perchlorate is highly oxidative and can be used by some bacteria isolates for cell respiration under anoxic conditions. This study detected the presence of *Pectobacterium* spp. inoculated in potato tubers immersed in iron perchlorate solution at 21%. The experiment was done at the plant virus laboratory at the Universidade Federal de Uberlândia-MG from August 2010 to March 2011. The experimental design was randomized blocks with four repetitions, as a 5 x 4 split plot in space, where the first factor was incubation time and the second one the four treatments, with grouped analysis for temperature. Seed-potatoes from cultivars Ágata and Atlantic, were used with a *Pectobacterium* spp. (A14) isolate from the collection of the Universidade Federal de Uberlândia, their bacterial suspension contained 10^{10} UFCs/ml ($OD_{550nm}=0,5$). Potato tubers were pierced with stylet or not, and dipped in the bacterial suspension or water. They were then placed in plastic containers with the bottom covered with dampened paper germiteste and closed with plastic bags and incubated at 22, 28 or 35°C for 0, 24, 48, 72 or 96 hours. Then the samples were immersed in the solution of iron perchlorate at a concentration of 21% for 10 minutes, removed and placed on a bench for a period of 20 minutes, being evaluated lesion size dark spot pierced with a ruler. It can be concluded that the iron perchlorate was able to signal the injury in the potato tubers in treatments inoculated perforated and non-inoculated, and not the presence of *Pectobacterium* spp, and The temperature of 35 ° C was more efficient signaling of the injuries.

Keywords: Bacteria, Ágata, Atlantic, seed-potato.

1 INTRODUÇÃO

O perclorato é um composto altamente oxidativo que tem sido encontrado na superfície da água em diversos estados dos EUA, como no Arizona, Arkansas, Califórnia, dentre outras. É considerado tóxico, provocando interferências na produção de iodo dos hormônios produzidos pela glândula da tireóide. Ele pode servir de aceptor de elétrons para diferentes isolados de bactérias e, portanto, pode ser degradado microbialmente na falta de oxigênio (LOGAN, 1998). É também utilizado como oxidante na combustão de fogos de artifício e é encontrado naturalmente em depósitos de nitrato no Chile que são usados em alguns fertilizantes (ATTAWAY; SMITH, 1993; URBANSKY et al., 2000).

Ele é altamente oxidado e não é reduzido em metais presentes na terra ou em ferro de valência zero. Por isso pode ser usado por alguns isolados de bactéria para respiração celular, sob condições anóxicas. É reduzido sequencialmente através de clorato e clorito para cloreto, ou como: $\text{ClO}_4^- \rightarrow \text{ClO}_3^- \rightarrow \text{ClO}_2^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{O}_2$. Apesar de o oxigênio ser produzido, ele é consumido pelas bactérias na “respiração do perclorato”, e, desta forma, não se acumula em soluções. A quebra dos seus intermediários: ClO_3^- e ClO_2^- não é acumulada para níveis mensuráveis (ATTAWAY; SMITH, 1993; HERMAN; FRANKENBERGER, 1999; MILLER; LOGAN, 2000).

De acordo os autores Logan (1998) e Herman e Frankenger (1999), o perclorato está presente tipicamente em águas subterrâneas e em concentrações muito baixas (<100 ppb), embora em alguns casos pode atingir concentrações de 20 ppm ou mais (7,27). O nitrato é também um co-contaminante comum e a redução microbiológica do perclorato em muitos sistemas tem sido encontrada para reduzir ou inibir a presença de nitrato.

Logan e La Point (2002), em estudos com reatores, verificaram as taxas de remoção de perclorato que poderiam alcançar em laboratório, para atingir a degradação completa do perclorato em sistemas de larga escala. Estes autores concluíram que as taxas de remoção do perclorato foram encontradas para uma função de log, onde a concentração do produto no reator atinge um longo intervalo que vai de 44 a 18.000 ppb; que o nitrato provavelmente diminuiu totalmente as taxas de remoção do perclorato, embora este efeito parece ser uma função de elétron doador e fonte de água; e que sistemas de escalas piloto são necessários para avaliar com mais precisão os

efeitos destes parâmetros diferentes na degradação de perclorato em biorreatores usados para tratamento de água potável.

As bactérias pectolíticas como *Pectobacterium carotovorum* possuem capacidade de infectarem uma série de plantas, causando doenças como a podridão mole, sendo responsáveis por perdas econômicas significativas na produção de batata a cada ano, podendo infectar uma planta hospedeira por várias vias e desencadear doenças nas folhas, caules e tubérculos (MOLE, et al 2010).

Segundo Charkowski (2009), os surtos de podridão mole em batatas são desencadeados geralmente por fatores ambientais, como chuva ou tempo quente, e podem atacar também durante o armazenamento e transporte de tubérculos, levando a perda total das culturas atacadas.

Como estes isolados podem ser encontrados em solos contaminados, bem como na água que é utilizada na irrigação da cultura, e ainda na água que a lavadeira usa durante o processo de lavagem dos tubérculos, os avanços tecnológicos para se identificar patógenos, conhecendo sua biologia, interações com outros microrganismos e o ambiente, é de fundamental importância no controle da disseminação dessas doenças, bem como da redução de perdas de culturas economicamente importantes.

Baseado no exposto, o objetivo deste trabalho foi de detectar a presença da *Pectobacterium* spp. inoculadas em tubérculos de batata mergulhados em solução de percloroeto de ferro à 21%.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação e condução do experimento

O experimento foi instalado e conduzido no laboratório de Virologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)-MG, entre os meses de agosto 2010 e março 2011.

Foram utilizadas batatas-semente das cultivares Ágata e Atlantic, fornecidas pelo Grupo Nascente, em São Gotardo-MG (G \square -minitubérculos) e Grupo Agrícola Wehrmann Ltda, em Cristalina-GO, e para as inoculações, utilizou-se o isolado UFU A14 de *Pectobacterium* spp., pertencente a coleção de trabalho do ICIAG/UFU, cultivado em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24 horas e a 28°C. Para a inoculação, a suspensão bacteriana continha 10¹⁰ unidades formadoras de colônias (UFCs)/ml e densidade óptica (OD_{550nm}=0,5).

Os tubérculos de batata foram lavados em água corrente e sabão detergente e deixados secar sobre uma bancada por 24 horas. Em seguida, foram imersos em álcool 96°, por 3 minutos, depois em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 5 minutos, e enxaguados em água destilada por três vezes (BENELLI et al., 2004).

Para auxiliar na leitura dos resultados, foram feitos dez círculos de 1 cm de diâmetro com caneta de retroprojeter na superfície dos tubérculos, distribuídos uniformemente, e o centro perfurado com estilete em forma de agulha e flambado.

Os tubérculos de batata foram perfurados ou não com estilete e inoculados com a suspensão bacteriana ou água destilada esterilizada.

Para inocular os tubérculos, os mesmos foram mergulhados na suspensão bacteriana e outro apenas com água destilada e autoclavada, sendo em seguida, retirados.

Após a secagem, os tubérculos foram alocados em recipientes de plástico com capacidade para 2 litros com o fundo coberto com papel germiteste levemente umedecido e fechados com sacolas plásticas simulando uma câmara úmida. Em seguida foram levados a seus ambientes de incubação, BOD e estufas, nas seguintes temperaturas: 22°C, 28°C e 35°C, por 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Após o período de incubação, os tubérculos foram mergulhados na solução de percloreto de ferro a 21% e por 10 minutos. Em seguida, retirados e colocados sobre a bancada por 20 minutos para secagem. Então realizou-se a leitura do diâmetro da lesão escurecida no ponto perfurado, com auxílio de uma régua.

A análise do estado sanitário dos lotes de tubérculos de batata foi realizada usando amostras de tecido interno dos tubérculos, cerca de pequenos quadrados (2 cm), colocadas em meio líquido 523 (KADO; HESKETT, 1970) e incubadas durante 24 horas a temperatura de 28 °C. Em seguida foram feitas diluições seriadas semeadas em meio sólido 523 (KADO; HESKETT, 1970) e incubadas a 28 °C durante 48 horas. Para o surgimento de colônias desenvolvidas isoladamente, estas foram examinadas quanto às características culturais, sendo realizados testes bioquímicos e fisiológicos que determinaram o gênero das bactérias isoladas.

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas no espaço 5 x 4, sendo o primeiro fator relativo aos tempos de incubação: 0, 24, 48, 72 e 96 horas e o segundo fator relativo aos tubérculos perfurados ou não e imersos na suspensão bacteriana ou água: P+I (perfurado + inoculado); NP+I (não perfurado + inoculado); P+A (perfurado + água) e NP+A (não perfurado + água). Os tratamentos constaram da combinação de cinco níveis localizados nas parcelas e quatro níveis localizados nas subparcelas, perfazendo um total de 80 parcelas, em que cada parcela foi considerada uma batata com dez perfurações avaliadas.

2.3 Análise conjunta de experimentos

Para a análise conjunta dos experimentos independentes, tomou-se como homogênea a relação 7:1 entre o maior e o menor quadrado médio dos experimentos dentro de cada temperatura, segundo Banzatto e Kronka (1992) e Pimentel-Gomes (2000).

2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Normalidade (Shapiro Wilk) e Homogeneidade (Levene), verificando a variabilidade dos dados, já o teste de aditividade (AD) verificou se houve interação entre os blocos e tratamentos. A análise de variância objetivou verificar a existência de diferenças entre os tratamentos. Para a comparação das médias, aplicou-se o teste de F, a 5% de significância, submetidos à análise do teste de Tukey. Para as análises, foram utilizados os programas estatísticos SPSS (NIE, 1975) para os testes de pressuposições e SISVAR (FERREIRA, 2008) para os demais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indicação de *Pectobacterium* spp. por percloroeto de ferro em tubérculos de batata –semente, inoculados do Grupo Nascente

Para os tubérculos de batata-semente cv. Ágata incubados a 22°C não houve diferença significativa entre os tubérculos perfurados ou não e inoculados ou não, no diâmetro das lesões formadas, não havendo também diferença significativa para os diferentes tempos avaliados (Tabela 5).

Na temperatura de 28°C, os tubérculos perfurados e inoculados ou não apresentaram maior diâmetro de lesões. Embora não tenha ocorrido diferença significativa nos tempos 0, 24 e 48 horas, foram nelas que tiveram as maiores atividades da bactéria + percloroeto identificados a partir do momento em que a batata teve contato com o produto (Tabela 5).

Já à 35°C, assim como à 28°C, os tubérculos perfurados e colocados em água e inoculados apresentaram maior diâmetro das lesões, 1,73 e 1,50 mm, respectivamente. Com relação aos tempos de avaliação, não foram encontradas diferenças significativas, desta forma o tempo para avaliar mostrou ser indiferente. Possivelmente, isto se deve ao fato de que por apresentarem uma perfuração na casca, foi facilitado a penetração e desenvolvimento das bactérias, contribuindo para que elas multiplicassem e agissem sobre o percloroeto na captura de oxigênio, corando na região onde houve perfuração no tubérculo (Tabela 5).

TABELA 5. Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Ágata (Grupo Nascente) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes temperaturas e tempos, Uberlândia-MG, 2010.

	Temperatura		
	22°C	28°C	35°C
NP+A	0,00 a	0,00 b	0,15 b
P+A	0,45 a	0,68 a	1,73 a
NP+I	0,00 a	0,00 b	0,00 b
P+I	0,65 a	0,63 a	1,50 a
	Tempos de incubação (horas)		
	0	24	48
0	0,56 a	0,61 ab	0,66 a
24	0,06 a	0,66 a	0,95 a
48	0,50 a	0,22 abc	0,75 a
72	0,12 a	0,01 c	0,77 a
96	0,12 a	0,11 bc	1,06 a
DMS temp.	0,14	0,18	0,38
DMS tempo	0,21	0,23	0,33
CVtemp.	14,20%	20,7%	31,62%
CVtempo	19,20 %	26,38 %	26,87%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) $F_{22^{\circ}\text{C}}=21,595$ (,000); $F_{28^{\circ}\text{C}}=26,200$ (,000) $F_{35^{\circ}\text{C}}=12,684$ (,000) e (Shapiro Wilk) $W_{22^{\circ}\text{C}}=,300$ (,000); $W_{28^{\circ}\text{C}}=,325$ (,000) $W_{35^{\circ}\text{C}}=,225$ (,000) e Aditividade ($AD_{\text{Ágata}35^{\circ}\text{C}}=1,020$ (**,317**), valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos normalmente distribuídos e aditividade de Tukey dos resíduos a significância de 0,05, respectivamente.

Para os testes realizados com a cultivar Atlantic em todas as temperaturas avaliadas, não houve diferenças significativas para os parâmetros avaliados, demonstrando um comportamento de independência entre os fatores analisados. O fato desta cultivar ser considerada resistente à bacteriose, e levando em consideração de que esta estava livre de patógenos no momento da montagem do experimento, devido sua origem (via micropropagação), reforça o aspecto destas não apresentarem halo escuro quando mergulhadas no perclorato de ferro (Tabela 6).

TABELA 6. Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Atlantic (Grupo Nascente) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes temperaturas e tempos, Uberlândia-MG, 2010.

	Temperatura		
	22°C	28°C	35°C
NP+A	0,00 a	0,00 a	0,00 a
P+A	0,08 a	0,07 a	0,30 a
NP+I	0,00 a	0,00 a	0,00 a
P+I	0,24 a	0,24 a	0,37 a
	Tempos de incubação (horas)		
	0	24	48
0	0,00 a	0,00 a	0,00 a
24	0,00 a	0,00 a	0,13 a
48	0,06 a	0,06 a	0,27 a
72	0,18 a	0,15 a	0,17 a
96	0,14 a	0,16 a	0,28 a
DMS temp.	0,22	0,11	0,25
DMS tempos	0,14	0,11	0,19
CVtemp.	21,82 %	11,04 %	24,59 %
CVtempo	13,36%	11,04 %	18,44 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) $F_{22^{\circ}\text{C}}=11,712$ (,000); $F_{28^{\circ}\text{C}}=13,175$ (,000) $F_{35^{\circ}\text{C}}=17,080$ (,000) e (Shapiro Wilk) $W_{22^{\circ}\text{C}}=,470$ (,000); $W_{28^{\circ}\text{C}}=,490$ (,000) $W_{35^{\circ}\text{C}}=,615$ (,000) e Aditividade ($AD_{Atl.35}$)=,096 (**,758**), valores em negrito indicam variâncias homogêneas, resíduos normalmente distribuídos e aditividade de Tukey dos resíduos a significância de 0,05, respectivamente.

O resultado do teste de sanidade dos tubérculos de Ágata e Atlantic foi negativo quanto à presença de bactérias endógenas (dados observados).

Comparando as temperaturas de 22°C, 28°C e 35°C, a que sinalizou melhor a reação da bactéria com o perclorato de ferro, devido ao tamanho do diâmetro, foi a de 35°C. Este resultado talvez possa ser justificado devido às características de crescimento do isolado UFU A14 utilizado na inoculação, uma vez que, ela foi identificada molecularmente como uma possível *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* ou uma *Dickeya chrysanthemi*, ambas com temperatura ideal de crescimento de 37°C. Além disto, deve-se levar em conta o fato desta cultivar ser considerada suscetível à bacteriose, sendo infectada rapidamente quando as condições ambientais são favorecidas (Tabela 7).

TABELA 7. Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Ágata do Grupo Nascente, Uberlândia-MG, 2011.

Temperaturas (°C)	Médias
22	1,05 b
28	0,86 c
35	1,23 a

DMS = 0,12

CV= 29,97 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) $F_{22^{\circ}\text{C}} = 21,595$ (,000); $F_{28^{\circ}\text{C}} = 26,200$ (,000) $F_{35^{\circ}\text{C}} = 12,684$ (,000) e (Shapiro Wilk) $W_{22^{\circ}\text{C}} = ,300$ (,000); $W_{28^{\circ}\text{C}} = ,325$ (,000) $W_{35^{\circ}\text{C}} = ,225$ (,000) e Aditividade ($AD_{\text{Ágata35}} = 1,020$ (**,317**), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Para a cultivar Atlantic do Grupo Nascente, não houve diferença significativa entre as temperaturas para a reação entre a bactéria e percloro de ferro. Da mesma forma, é provável que isto tenha ocorrido devido ao fato desta cultivar ser considerada resistente à bacteriose além de ser originada da micropropagação (Tabela 8).

TABELA 8. Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Atlantic do Grupo Nascente, Uberlândia-MG, 2011.

Temperaturas (°C)	Médias
22	1,03 a
28	1,01 a
35	1,05 a

DMS = 0,06

CV= 15,57 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) $F_{22^{\circ}\text{C}} = 11,712$ (,000); $F_{28^{\circ}\text{C}} = 13,175$ (,000) $F_{35^{\circ}\text{C}} = 17,080$ (,000) e (Shapiro Wilk) $W_{22^{\circ}\text{C}} = ,470$ (,000); $W_{28^{\circ}\text{C}} = ,490$ (,000) $W_{35^{\circ}\text{C}} = ,615$ (,000) e Aditividade ($AD_{\text{Atl.35}} = ,096$ (**,758**), , valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

3.2 Indicação de *Pectobacterium* spp. por percloroeto de ferro em tubérculos de batata-semente, inoculados do Grupo Agrícola Wehrmann Ltda

Para a cultivar Ágata nas temperaturas de 22°C e 28°C, nos tubérculos de batata perfurados ou não e inoculados ou não, e nos tempos de incubação testados, não foi possível realizar a análise estatística, pois as variâncias foram nulas.

Analizando a tabela 9, verificou-se que nos tempos de incubação e nos tratamentos analisados de 0, 24 e 48 horas de incubação, não houve diferença no diâmetro das lesões (mm).

Ainda na tabela 9, com relação aos tempos de incubação de 72 e 96 horas, verificou-se que, tubérculos perfurados e não inoculados apresentaram o maior tamanho de lesão (6,18 mm) em 72 horas, assim como em 96 horas (5,60mm). Quando os tubérculos foram perfurados e inoculados, apresentaram a mesma tendência, sendo o tamanho das lesões de 2,88 e 1,88 mm para 72 e 96 horas, respectivamente.

TABELA 9. Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Ágata (Grupo Agrícola Wehrmann) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes tempos de incubação na temperatura de 35°C, Uberlândia-MG, 2011.

Tratamentos	Tempos de incubação (horas)				
	0	24	48	72	96
NP+A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 b A	1,02 b A
P+A	0,43 a C	0,63 a C	1,43 a BC	6,18 a A	5,60 a AB
NP+I	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 b A	0,00 b A
P+I	0,23 a B	0,75 a AB	0,48 a AB	2,88 a A	1,88 ab AB

DMS trat.= 0,85

DMS Tempo= 0,88

CVtrat.= 46,67 %

CVtempo= 41,23 %

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) F= 13,109 (,000) e (Shapiro Wilk) W= ,648 (,000) e Aditividade (AD_{Ágata35})=44,650 (,000), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Nas temperaturas de 22°C e 28°C para a cv. Atlantic (Tabela 10), os tubérculos perfurados e colocados em água (0,13 e 0,25) e inoculados (0,11 e 0,32), respectivamente, apresentaram maior diâmetro de lesão em mm.

Já os tempos de incubação não foram significativos para estas mesmas temperaturas, mostrando que são indiferentes quanto ao período de incubação no surgimento de lesões escuras (Tabela 10).

TABELA 10. Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Atlantic (Grupo Agrícola Wehrmann) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes tempos de incubação nas temperaturas de 22°C e 28°C, Uberlândia-MG, 2011.

	Temperaturas	
	22°C	28°C
NP+A	0,00 b	0,00 b
P+A	0,13 a	0,25 a
NP+I	0,00 b	0,00 b
P+I	0,11ab	0,32 a
	Tempos de incubação (horas)	
0	0,15 a	0,25 a
24	0,04 a	0,17 a
48	0,00 a	0,10 a
72	0,01 a	0,06 a
96	0,08 a	0,13 a
DMS temperatura	0,07	0,11
DMS tempo	0,10	0,14
CVtemperatura	9,49 %	14,10 %
CVtempo	13,50 %	17,20 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) $F_{22^{\circ}\text{C}} = 10,755$ (,000); $F_{28^{\circ}\text{C}} = 20,750$ (,000) e (Shapiro Wilk) $W_{22^{\circ}\text{C}} = ,545$ (,000); $W_{28^{\circ}\text{C}} = ,744$ (,000) e Aditividade ($AD_{Atl.22,28}$)=74,947;69,692;(,000), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

O fato da cultivar Atlantic ser considerada resistente à bacteriose e ter apresentado um comportamento de suscetibilidade pode ser explicado pela sua origem, uma vez que ela veio do cultivo convencional e não via micropropagação. Desta forma, então provavelmente nestes tubérculos havia a bactéria em estado latente. Este dado pode ser comprovado pelo teste de sanidade, com resultado positivo quanto à presença da bactéria (Figura 3).

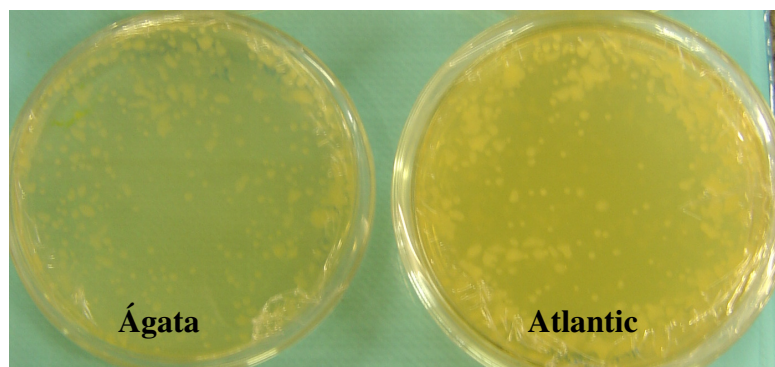


FIGURA 3. Resultado do teste de sanidade para tubérculos de batata-semente, cultivares Ágata e Atlantic do Grupo Wehrmann Ltda, Uberlândia-MG, 2011.

Na temperatura de 35°C (Tabela 11) para os tubérculos da c. Atlantic, os tempos de incubação foram indiferentes com relação aos tratamentos, apresentando médias para os diâmetros iguais, com exceção do tempo de incubação de 72 horas, onde não apresentou diâmetro das lesões em mm nos tratamentos não perfurado e não inoculado (0,00) e não perfurado e inoculado (0,00), e em 96 horas de incubação no tratamento não perfurado e não inoculado (0,65) e não perfurado e inoculado (0,20). Este comportamento também foi observado para a cultivar Ágata, nesta mesma temperatura.

No tempo de incubação de 96 horas, para os tubérculos perfurados e inoculados, o maior diâmetro de lesão foi 5,93mm, diferindo significativamente dos demais tempos de incubação.

Assim, a cv. Atlantic, com pouco tempo de incubação, foi capaz de sinalizar a presença da bactéria, em conjunto com o percloroeto de ferro, em praticamente todos os tratamentos, exceto para o perfurado e inoculado (5,93) que apresentaram maior média de diâmetro somente em 96 horas de incubação (Tabela 11). De forma geral, estes resultados foram semelhantes aos da cv. Ágata à 35°C.

Com base nos resultados encontrados diante a sinalização do percloroeto de ferro, pode-se direcionar o destino de lotes de batatas nas lavadeiras.

TABELA 11. Diâmetro da lesão (mm) de tubérculos de batata cv. Atlantic (Grupo Agrícola Wehrmann) perfurados ou não e inoculados ou não, sob diferentes tempos de incubação na temperatura de 35°C, Uberlândia-MG, 2011.

Tratamentos	Tempos de incubação				
	0	24	48	72	96
NP+A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 b A	0,65 b A
P+A	0,15 a A	0,61 a A	0,55 a A	1,38 a A	0,48 b B
NP+I	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 b A	0,20 b A
P+I	0,25 a B	0,93 a B	0,40 a B	0,80 a B	5,93 a A

DMS trat.= 0,52

DMS tempo= 0,58

CVtrat.= 22,39 %

CVtempo= 30,64 %

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. *Significativo e ^{ns} não significativo para os testes de pressuposições de Homogeneidade (Levene) F= 10,415 (,000) e (Shapiro Wilk) W= ,576 (,000) e Aditividade (AD_{At135})=42,639 (,000) , valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Já para a cultivar Ágata do Grupo Agrícola Wehrmann, as temperaturas diferiram estaticamente, sendo a temperatura de 35°C a que apresentou maior diâmetro de lesões (Tabela 12), sinalizando mais rapidamente do que as outras temperaturas a presença de bactérias nos tubérculos.

Isto pode ter ocorrido devido às características de crescimento do isolado UFU A14 utilizado na inoculação, uma vez que, ela foi identificada molecularmente como uma possível *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* ou uma *Dickeya chrysanthemi*, ambas com temperatura de crescimento de 37°C. Além disto, deve-se levar em conta o fato de que, embora a cultivar seja considerada resistente à bacteriose, os tubérculos foram inoculados com suspensão bacteriana, proporcionando rápido crescimento, uma vez que estava em condições que favoreciam à bactéria.

TABELA 12. Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Ágata (Grupo Agrícola Wehrmann), Uberlândia-MG, 2011.

Temperaturas (°C)	Médias
22	0,7 b
28	0,7 b
35	1,05 a

DMS = 0,12

CV= 41,56 %

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) F= 13,109 (,000) e (Shapiro Wilk) W= ,648 (,000) e Aditividade (AD_{Ágata22,28,35})=; 5,301 (,000); ,000 (**1,000**); 44,650 (,000), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Na cultivar Atlantic do Grupo Agrícola Wehrmann (Tabela 13) a temperatura de 35°C diferiu significativamente das demais, respondendo melhor ao teste em relação ao surgimento de lesões escuras, indicando portanto que ocorre uma reação entre a *pectobactéria* inoculada e o percloroeto de ferro. Como justificativa do surgimento de lesões em temperaturas baixas e medianas nesta cultivar, deve-se levar em conta sua origem, procedentes do cultivo convencional, assim, a chance de virem contaminadas pode ser grande. Este fato foi comprovado pelo teste de sanidade, indicando a contaminação dos lotes de Ágata e Atlantic (Figura 3).

TABELA 13. Médias da análise conjunta dos dados para as temperaturas testadas na cultivar Atlantic (Grupo Agrícola Wehrmann), Uberlândia-MG, 2011.

Temperaturas (°C)	Médias
22	0,70 a
28	0,70 a
35	1,07 b

DMS = 0,13

CV= 41,56 %

Médias seguidas por letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si, pelo teste tukey, a 0,05 de significância. (Levene) F= 10,415 (,000) e (Shapiro Wilk) W= ,576 (,000) e Aditividade (AD_{Atl.22,28,35})=74,947;69,692;42,639 (,000), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Com base neste teste, percebe-se que o percloroeto age como um sinalizador na detecção das *pectobactérias* em tubérculos de batata, e ainda, serve também para indicar a qualidade dos lotes em relação à danos mecânicos, pois de acordo com os resultados

obtidos verificou-se que não só nos tratamentos inoculados ocorreu a presença de lesões escuras formadas, mas também nos tratamentos que foram perfurados e colocados em água destilada e autoclavada. Esses resultados estão de acordo com as empresas francesas que utilizaram este produto como indicativo de lotes que não devem ser armazenados ou devem seguir rapidamente para o consumo, devido a presença de bactérias e/ ou danos mecânicos detectados pelo teste, evitando assim as perdas dos lotes por contaminação de patógenos.

As bactérias sobrevivem na forma latente nas lenticelas e ferimentos suberizados ou nos tecidos vasculares de tubérculos que aparentemente estão livres do patógeno, quando são colhidos. Quando as condições favorecem a multiplicação do patógeno e a produção de enzimas pectolíticas, o tubérculo apodrece e a bactéria se dissemina (ELPHINSTONE, 1993). De acordo Lopes e Henz (1998), a maior ocorrência e severidade das podridões-moles acontecem em condições de alta temperatura, acima de 25°C. O mesmo foi observado neste trabalho, quando os melhores resultados para a detecção de bactérias em tubérculos de batata ocorreram com temperaturas elevadas.

Segundo Haider (1999), a temperatura afeta a atividade metabólica, o consumo de substrato pelos microrganismos e, por consequência, a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Essa biodegradação ocorre numa ampla faixa de temperatura, mas as maiores taxas ocorrem entre 25 e 35°C. Esta mesma amplitude de temperatura para a atividade das bactérias também foi observada neste trabalho.

O fato da cultivar Ágata, de ambos locais (Grupo Nascente e Wehrmann), apresentar sintomas de podridão-mole é justificável devido ser considerada bastante suscetível à bactéria, quando exposta sob condições de alta precipitação pluviométrica ou em condições ambientais favoráveis. Já com relação aos resultados da cv. Atlantic encontrados, dizem respeito à resistência baixa ou intermediária às demais doenças de maior importância no país, como as podridões (BORGES et al., 2008).

Segundo Czajkowski e outros (2011) apud Pérombelon e colaboradores (1989), um fator importante no desenvolvimento de podridões é o nível de água no solo. Segundo eles, a presença de um filme de água na superfície do tubérculo induz a condições anaerobióticas em batatas sementes, favorecendo assim a multiplicação da bactéria e o início da podridão. A anaerobiose afeta a resistência do hospedeiro dependente de oxigênio, permitindo que a bactéria cresça sem nenhum obstáculo, produzindo enzimas de degradação da parede celular e resultando numa lesão apodrecida (FUQUA et al., 2001). Talvez isso explique o fato de que mesmo utilizando

cultivares consideradas resistentes à bacteriose como a cv. Atlantic, mas que foram inoculadas com suspensão bacteriana, tenham surgido lesões escuras quando em contato com a bactéria e o produto testado, uma vez que o percloroeto em solução aquosa pode liberar moléculas de Cl e O₂, sendo este último captado pelas bactérias para sua respiração.

Não existem cultivares de batatas comerciais, que são naturalmente imunes à podridão-mole e à canela preta causadas pela *Dickeya* e *Pectobacterium* spp., mas algumas cultivares parecem ser parcialmente resistentes (LYON, 1989). A ocorrência de produção de batatas com níveis de resistência parcialmente bem sucedidos, nunca resultou em cultivares imunes, talvez pelo fato de uma estreita faixa de diversidade genética no material parental para reprodução utilizado (TZENG et al., 1990).

Os pesquisadores Okeke e Frankenberger (2005), explorando o potencial de biorredução do perclorato de águas contaminadas por meio de um consórcio com bactérias aminolíticas, amido e casca de batatas, verificaram que a concentração do produto diminuiu substancialmente em meio de cultura inoculada com o consórcio de bactérias juntamente com *Dechlorosoma* spp.. Estes autores encontraram taxas de remoção do produto acima de 90% em apenas quatro dias de inoculação, e a medida que as cascas eram consumidas pelas bactérias, ocorria a redução do perclorato, com diminuição significativa em 24 horas. Eles concluíram, portanto, que os microorganismos aminolíticos e *Dechlorosoma* spp. podem ser economicamente usados para realizar a completa remoção do perclorato nestas águas.

Estes resultados vão de encontro aos do trabalho, já que com pouco tempo de incubação, a partir do tempo zero e até em 72 horas (4 dias) de incubação em contato com o percloroeto de ferro, havia a formação de lesões escuras, indicando a redução do percloroeto pelas pectobactérias presentes nos tubérculos, igualmente como para o perclorato, uma vez que ambos produtos químicos possuem o mesmo efeito de redução e liberação de oxigênio em solução aquosa na presença de bactérias redutoras.

Desta forma, de acordo com os autores acima, a pectobactéria utilizada neste trabalho realizou a redução do produto, consumindo o oxigênio liberado por consequência da quebra da molécula em solução aquosa, e consequente escurecimento da área lesionada, indicando, como esperado, a presença de bactéria nos tubérculos. Ainda segundo os autores apenas visualmente, sem a aplicação do produto, não se pode afirmar se os tubérculos estão ou não colonizados por bactérias. Wu e outros (2001) também obtiveram taxas de perclorato em rápido decréscimo dentro de quatro dias, não

sendo mais detectado em sete dias nas amostras de solos do Texas-EUA, na presença de bactérias redutoras do produto.

Esta redução do perclorato e também de clorato, segundo Van Ginkel e outros (1995), é de responsabilidade de uma única enzima capaz de catalisar esta redução.

Xu e colaboradores (2004), investigando os caminhos de redução do nitrato e do clorato separadamente induzidos pelas bactérias *Dechlorosoma* sp. e *Pseudomonas* sp., no consumo de perclorato e clorato pela respiração das bactérias, observaram que enquanto a atividade de clorato redutase e clorito dismutase foram induzidas em *Dechlorosoma* sp pelo clorato ou perclorato em condições anaerobióticas, estas duas enzimas foram constitutivamente expressas pela *Pseudomonas* sp. em condições anaeróbicas e aeróbicas, independente da presença de clorato, e para surpresa dos pesquisadores este foi o primeiro relato da expressão constitutiva de ambas enzimas em uma bactéria.

A atividade do clorato e perclorato redutase foi localizada dentro de frações periplasmáticas para isolados de *Dechlorosoma* sp e *Pseudomonas* sp., indicando que estas enzimas são solúveis e não estão ligadas à membrana (STEINBERG et al., 2005). Bem como enzimas de isolados GR-1 (KENGEN et al., 1999), *Dechlorosoma* sp. *perclace* (OKEKE et al., 2003; GIBLIN; FRANKENBERGER, 2001) e de *Ideonella dechloratans* (THORELL et al., 2003). Em contraste, a nitrato redutase A, que possui atividade de redutase clorato e redutase clorato C de *Proteus mirabilis*, está ligada à membrana citoplasmática (OLTMANN et al., 1976).

Este efeito provocado pela bactéria em associação do percloroeto pode ser considerado de biorremediação desses microorganismos. Assim, como várias bactérias e fungos lignolíticos e não-lignilíticos utilizam como estratégia (JACQUES et al., 2007) para a eliminação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do solo, através da biorremediação, na qual os microrganismos que apresentam capacidade de metabolizar estes compostos irão transformá-los em substâncias inertes, CO₂ e água.

No caso do perclorato, eles são transformados em moléculas não tóxicas ao ambiente, de cloro e oxigênio, sendo reduzidos através do ClO₄⁻, com o consumo do O₂ pelas bactérias (LOGAN, et al., 2002). Baseado nesta ideia, supõe-se então que as pectobactérias, em contato com o percloroeto, consomem o O₂ quebrado por elas utilizando no seu crescimento e desenvolvimento, aumentando a área da lesão com mudança de cor do tecido vegetal escurecendo o local, devido às características

intrínsecas ao percloroeto. Segundo Logan (1998), a oxidação de hidrogênio pode ser usada para auxiliar na redução microbiana do perclorato.

Há estudos em que o nitrato pode inibir completamente a degradação do percloroeto em condições oxidantes de acetato (GERMGARD et al., 1981). Mas em condições oxidantes de hidrogênio, ele não consegue degradá-lo. Isto foi comprovado pelo fato de apesar de o nitrato ter uma concentração muito maior que o percloroeto, em testes de águas subterrâneas em áreas do Canadá, não houve mudança mensurável nas taxas de remoção (LOGAN e LA POINT, 2002). O mesmo foi encontrado por Chaudhuri e colaboradores (2002) apud Bruce e outros (1999), trabalhando com os efeitos de nitrato e percloroeto em meios de cultura para *Dechlorosoma suillum*, relatando que a presença do nitrato teve pouco efeito sobre a redução do perclorato pelo isolado *Dechloromonas agitata*, não podendo utilizar o nitrato como receptor de elétrons alternativos para seu crescimento e havendo uma preferência pelo perclorato (BRUCE et al., 1999).

Os resultados deste trabalho mostram também que as pectobactérias estão dentro do grupo de microrganismos capazes de reduzir o percloroeto, fato que nem todas são capazes de fazer (WU et al., 2001; MULVANEY, 1999; LOGAN et al., 2001). Em contrapartida, Steinberg e outros (2005) apud Coates e outros (1999) e Logan (1998) afirmam que toda bactéria capaz de captar o O₂ de perclorato pode respirar usando clorato, mas o contrário não é necessariamente verdadeiro. Bactérias capazes de utilizar o clorato na sua respiração, mas não o perclorato, são membros pertencentes de *Proteus*, *Pseudomonas*, e *Rhodobacter*.

4 CONCLUSÕES

O percloroeto de ferro foi capaz de sinalizar os danos físicos nos tubérculos de batata nos tratamentos perfurados inoculados e não inoculados, mas não a presença de *Pectobacterium* spp.

A temperatura de 35°C foi mais eficiente na sinalização das injúrias.

REFERÊNCIAS

- ATTAWAY, H.; SMITH, M. Reduction of perchlorate by an anaerobic enrichment culture. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 408–12, 1993.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 1992. 247p.
- BENELLI, A.I.H.; et al. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p.155-159, 2004.
- BORGES, M., LUZ, J. M. Q., SILVA, I. R., FRANÇA, R. O. **O cultivo da batata no Brasil**: aspectos gerais da cultura. Itapetininga, SP: Associação Brasileira da Batata, 156 p; 2008.
- BRUCE, R. A.; ACHENBACH, L. A.; COATES, J. D. Reduction of (per)chlorate by a novel organism isolated from a paper mill waste. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.1, p. 319–331, 1999.
- CHARKOWSKI, A. O. Decaying signals: Will understanding bacterial plant communications lead to control of soft rot? **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, p.178-184, 2009.
- CHAUDHURI, S. K.; et al. Environmental Factors That Control Microbial Perchlorate Reduction. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n.9, p. 4425–4430, 2002.
- COATES, J. D.; MICHAELIDOU, U.; BRUCE, R. A., O’CONNOR, S. M.; CRESPI, J. N.; ACHENBACH, L.A. The ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p.5234–5241, 1999.
- CZAJKOWSKI, R.; et al. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 999–1013, 2011.
- ELPHINSTONE, J.G. Ecologia de espécies pectolíticas de *Erwinia* causantes de pudricion blanda y pierna negra de la papa. In: Lopes, C. A.; Espinoza R. N. (Eds). Taller sobre enfermedades bacterianas de la papa. Brasília. **EMBRAPA/CNPQ**. p.59-66, 1993.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E.P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, Califórnia, v.35, p.439–68, 2001.

GERMGARD, U.; TEDER, A.; TORMUND, D. Chlorate formation during chlorine dioxide bleaching of softwood kraft pulp. **Paperi ja Puu**, n.3, p. 127-133, 1981.

GIBLIN, T.; FRANKENBERGER JR., W.T. Perchlorate and nitrate reductase activity in the perchlorate-respiring bacterium *perclace*. **Research in Microbiology**, Paris, v.156, p.311–315, 2001.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA. p.33-51, 1999.

HERMAN, D.C.; FRANKENBERGER, W. T. Bacterial reduction of perchlorate and nitrate in water. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 28, p. 1018–24, 1999.

JACQUES, R. J. S.; et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.7, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

KENGEN, S.W.; et al. Purification and characterization of (per)chlorate reductase from the chlorate-respiring strain GR-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 6706–6711, 1999.

LOGAN, B. E. A review of chlorate- and perchlorate- respiring microorganisms. **Bioremediat Journal**, London, v. 2, P. 69-79, 1998.

LOGAN, B. E.; LA POINT, D. Treatment of perchlorate- and nitrate-contaminated groundwater in an autotrophic, gas phase, packed-bed bioreactor. **Water Research**, New York, v. 36, p. 3647–3653, 2002.

LOGAN, B. E.; ZHANG, H.; MULVANEY, P.; MILNER, M. G.; HEAD, I. M.; UNZ, R. F. Kinetics of perchlorate- and chlorate-respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2499–2506, 2001.

LOGAN, B.E.; LAPOINT, D. Treatment of perchlorate- and nitrate-contaminated groundwater in an autotrophic, gas phase, packed-bed bioreactor. **Water Research**, New York, v. 36, p. 3647–3653, 2002.

LOPES, C. A.; HENZ, G. P. Podridão-mole das hortaliças causadas por bactérias. Brasília: **Embrapa Hortaliças**. 1998. (Comunicado técnico, 8).

LYON, G. D. The biochemical basis of resistance of potatoes to soft rot *Erwinia* spp. a review. **Plant Pathology**, Oxford, v. 38, p. 313–39, 1989.

MILLER, J. P.; LOGAN, B. E. Sustained perchlorate degradation in an autotrophic, gas phase, packed bed bioreactor. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 34, p. 3018–22, 2000.

MOLE, B.; et al. Gluconate Metabolism Is Required for Virulence of the Soft-Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.23, n. 10, p. 1335–1344, 2010.

MULVANEY, P. Perchlorate and chlorate reduction by axenic cultures. M.S. Thesis. **Environmental Pollution and Control**, Springfield, The Pennsylvania State University, University Park, PA, 1999.

NIE, H. N. **SPSS**: estatistical package for the social sciences. Book. Publisher: New York, McGraw-Hill, 1975.

OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER JR.; W. T. Molecular analysis of a perchlorate reductase from a perchlorate-respiring bacterium perlace. **Research in Microbiology**, Paris, v.158, p.337–344, 2003.

OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER JR, W. T. Use of starch and potato peel waste for perchlorate bioreduction in water. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 347, p. 35– 45, 2005.

OLTMANN, L. F.; REIFNDERS, W. N.; STOUTHAMER, A. H. The correlation between the protein composition of cytoplasmic membranes and the formation of nitrate reductase A, chlorate reductase C and tetrathionate reductase in *Proteus mirabilis* wild type and some chlorate resistant mutants. **Archiev Microbiology**, Berlin, v.111, p. 25– 35, 1976.

PIMENTEL, G. F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.

PÉROMBELON, M.C.M.; et al. Factors affecting potato blackleg development. In: Tjamos EC, Beckmann CH, eds. Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on the Interacton of Genetic and Environmental Factors in the Development of VascularWilt Diseases of Plants, Cape Sounion, Greece. Berlin, Germany. **Springer-Verlag**, New York, p. 421–31, 1989.

STEINBERG, L. M.; TRIMBLE, J. J.; LOGAN, B. E. Enzymes responsible for chlorate reduction by *Pseudomonas* sp. are different from those used for perchlorate reduction by *Azospira* sp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n. 247, p. 153-159, 2005.

THORELL, H. D.; et al. A gene cluster for chlorate metabolism in *Ideonella dechloratans*. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v.69, p. 5585– 5592, 2003.

TZENG, K. C.; MCGUIRE, R.; KELMAN, A. Resistance of tubers from different potato cultivars to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 67, p. 287–305, 1990.

URBANSKY, E.T.; et al. Comment on Perchlorate identification in fertilizers and the subsequent addition/correction. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 34, p. 4452–4453, 2000.

VAN GINKEL, C.G.; PLUGGE, C.M.; STROO, C. A. Reduction of perchlorate with various energy substrates and inocula under anaerobic conditions. **Chemosphere**, Oxford, n.31, p. 4057– 66, 1995.

WU, J.; UNZ, R. F.; et al. Persistence of perchlorate and the relative numbers of perchlorate- and chlorate-respiring microorganisms in natural waters, soils, and wastewater. **Bioremediation Journal**, London, v 5, p. 119–130, 2001.

XU, J.; et al. Chlorate and nitrate reduction pathways are separately induced in the perchlorate-respiring bacterium *Dechlorosoma* sp. KJ and the chlorate-respiring bacterium *Pseudomonas* sp. PDA. **Water Research**, New York, n. 38, p. 673–680, 2004.

.

CAPÍTULO 5

RESUMO

Influência da temperatura no armazenamento e transporte na qualidade de lotes de batata

De acordo com levantamentos, pode-se estimar que as perdas em batata no Brasil podem variar de 0% a 100%, dependendo da cultivar, beneficiamento, local, época do ano, classe do produto, etapa da cadeia considerada como: armazenamento e transporte, além de outros fatores. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a melhor temperatura para armazenagem e transporte das cultivares Ágata e Asterix, baseados em notas pré-determinadas. O experimento foi instalado e conduzido no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Federal de Uberlândia-MG, nos meses de abril e maio de 2011. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial triplo, com dois tempos de avaliação: 12 e 24 horas, cinco temperaturas: 8°C, 18°C, 28°C, 38°C e 48°C, e Lote 1 e lote 2, com quatro repetições para cada amostra. As amostras de tubérculos de batata utilizadas foram provenientes do Centro Estadual de Abastecimento (CEASA Uberlândia-MG) e incubadas por 12 e 24 horas à 8°C, 18°C, 28°C, 38°C e 48°C, sendo 04 amostras para cada tempo de avaliação em cada temperatura avaliada. Os tubérculos foram mergulhados em solução de percloroeto de ferro a 8%, e por 10 minutos. Em seguida, foram retirados e deixados em repouso sobre bandejas, por 20 minutos. Foram avaliados pela escala de notas, avaliando de 0 a 4, quanto ao tamanho das manchas presentes. Verificou-se o grau de manchas circulares escuras que surgiam após contato com o percloroeto de ferro, inferindo assim o grau de dano da amostra pela pectobactéria, e o número de batatas podres que apareciam a cada tempo de incubação. A cada teste, foi realizada uma amostra controle em cada lote, em temperatura ambiente e aplicando nota a ela, realizando um confronto destas notas a cada avaliação realizada. Contudo, conclui-se que temperaturas acima de 28°C foram suficientes para indicar a qualidade dos tubérculos armazenados, quando mergulhados na solução de percloroeto de ferro, e que o maior número de batatas podres foi observado em temperaturas próximas a 48°C.

Palavras-chave: Ágata, injúrias, percloroeto de ferro, escala de nota.

ABSTRACT

Indication of pectobacteria by iron perchlorate in commercial potato batches

According to surveys, potato losses in Brazil vary from 0% to 100%, depending on cultivar, post harvest processing, location, time of the year, product class, and position analyzed in the chain, such storage or transport, besides other factors. Therefore, this study determined the best storage and transport temperatures for cultivars Ágata and Asterix, based on predetermined ratings. The experiment was done in the Horticulture Laboratory at the Universidade Federal de Uberlândia-MG from April to May 2011. The experimental design was completely randomized, as triple factorial, with five temperatures: 8, 18, 28, 38 and 48°C, two evaluation times: 12 and 24 hours and two batches: Batch 1 and batch 2, with four repetitions per sample. The samples used were from the Centro Estadual de Abastecimento (CEASA Uberlândia-MG). The samples were evaluated twice: 12 and 24 hours, and at five temperatures: 8, 18, 28, 38 and 48°C, with 04 samples for each time and temperature evaluated. The tubers were dipped in a solution of iron perchlorate to 8% for 10 minutes. They were then removed and allowed to settle on trays for 20 minutes. Were assessed by evaluating grading scale from 0 to 4, regarding the size of the spots presents. There was the degree of circular dark spots that appeared after contact with the iron perchlorate, thus inferring the degree of damage of the sample by pectobacteria; and the number of rotten potatoes that appeared each incubation time. Each test was performed a control sample in each batch at room temperature by applying a note to her, making a comparison of these notes to each evaluation. However, it is concluded that temperatures above 28°C were sufficient to indicate the quality of stored tubers when immersed in the solution of iron perchlorate, and that a greater number of rotten potatoes was observed at temperatures around 48°C.

Keywords: Ágata, injuries, iron perchlorate, rating scale.

1 INTRODUÇÃO

A batata é uma das hortaliças mais plantadas no Brasil, com grande expressão econômica em diversos estados e regiões. Atualmente, em nosso país, duas alternativas têm sido utilizadas para beneficiamento e classificação após a colheita. A mais comum é levar a batata para um galpão onde, sobre esteiras, sofre uma lavagem ou escoamento mecânico, e em seguida uma nova secagem. Esta é mais popular, porque torna os tubérculos mais limpos e atraentes; a outra alternativa é a escovação, tecnicamente mais recomendável para evitar perdas por deterioração (HENZ, 1993); sendo selecionada e classificada manualmente ou mecanicamente. Depois de ensacada, as batatas são transferidas para um armazém, de onde podem ser retiradas conforme a demanda (FINGER; FONTES, 1999). São nestas unidades, conhecidas por “Lavadoras,” que as batatas são classificadas e beneficiadas.

O processo de lavagem pode aumentar a incidência de deterioração em relação aos tubérculos não lavados, sendo difícil prever a quantidade porque dependem de uma série de fatores, como cultivar, época do ano, oscilações climáticas, incidência de pragas e doenças, alterações no mercado, etc. De acordo com levantamentos, pode-se estimar que as perdas em batata no Brasil podem variar de 0% a 100%, dependendo da cultivar, beneficiamento, local, época do ano, classe do produto, etapa da cadeia considerada como: armazenamento e transporte, além de outros fatores. As causas das perdas são diversas e incluem principalmente a deterioração dos tubérculos causada por patógenos, dentre eles as *pectobactérias*, causadoras da podridão mole, defeitos na aparência, como injúrias mecânicas e lesões de fungos e bactérias, incluindo a demora na venda do produto no varejo (HENZ; BRUNE, 2004).

No entanto, há algumas medidas gerais que podem contribuir para a redução dessas perdas, podendo ser adotadas pelos diferentes segmentos da cadeia produtiva da batata. Para Henz (2004), contribuições simples, como: ajuste das máquinas de beneficiamento para evitar quedas acentuadas e ferimentos desnecessários nos tubérculos; o ajuste da temperatura e a velocidade do vento do túnel de secagem para evitar danos excessivos à película dos tubérculos, no caso da batata lavada; armazenagem em local com pouca luz, fresco, seco e bem ventilado por períodos curtos

de no máximo cinco dias; utilização de refrigeração de 7 a 12°C, no caso de um armazenamento mais prolongado.

Muitos são os detalhes a serem observados para atenuar as perdas quantitativas e qualitativas dos produtos agrícolas. O perfeito acondicionamento dos produtos em embalagens adequados às suas características é o primeiro passo para minimizar estes efeitos; sendo o transporte e manuseio na hora da comercialização aspectos básicos e fundamentais para evitar perdas e garantir a boa qualidade (MARTINS; FARIAS, 2002).

Na tentativa de minimizar essas perdas, indicando para isso qual o melhor destino do lotes recém lavados nas lavadoras, foram testadas notas indicativas de bactérias baseadas na imersão de tubérculos de batata no percloroeto de ferro, tendo como base os resultados do capítulo 2, podendo o beneficiador, ainda na lavadora, definir o destino aos quais os lotes devem ter de acordo a nota recebida; se podem ficar armazenados ou se devem seguir de imediato ao consumo.

De acordo com essas informações, o trabalho teve como objetivo determinar a melhor temperatura para transporte e armazenamento das cultivares Ágata e Asterix, tendo como parâmetro notas pré-determinadas e o número de batatas podres em cada tempo de incubação, qualificando os lotes de batatas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação e condução do experimento

O experimento foi instalado e conduzido no laboratório de Fitotecnia da Universidade Federal de Uberlândia- MG, nos meses de abril e maio de 2011. As amostras utilizadas foram provenientes do Centro Estadual de Abastecimento (CEASA, Uberlândia-MG).

Foram utilizados como amostra sacos de 25 kg de tubérculos de batatas, provenientes de Araxá-MG (Latitude: 19°33'45=S, Longitude: 46°56'15=W); São Gotardo-MG (Latitude:19°18'45=S, Longitude:46°03'45=W); Patrocínio-MG (Latitude:19°56'15=S, Longitude: 46°56'15=W), Palmas-PR (Latitude: 26°26'15=S, Longitude: 51°56'15=W) e amostras para um teste coletados no CEASA de Uberlândia-MG, cuja origem foi desconhecida. As cultivares trabalhadas foram: Ágata e Asterix, devido à disponibilidade no CEASA. Com exceção dos tubérculos provenientes de Palmas-PR, que foram lavados cerca de três dias antes de sua entrada no CEASA-Uberlândia, todos os outros passaram pela lavadora um dia antes. Os tubérculos foram pré-selecionados durante a montagem do ensaio, evitando colocar tubérculos danificados pelo transporte a fim de evitar interferências no momento da leitura do teste, sendo separados por amostras de acordo a origem e cultivar.

Para cada teste realizado, foram separadas duas amostras aleatoriamente com seis (06) tubérculos das cultivares e colocados dentro de redes de nylon. As amostras foram separados da seguinte forma: amostras somente com batatas da cultivar Ágata ou amostras com Ágata e Asterix. Elas foram diferenciadas por uma fita crepe identificando-as, sendo a mesma fixada na rede.

Foram feitos seis testes neste experimento, de acordo com a origem e cultivar de cada amostra proveniente do CEASA (Tabela 14)

TABELA 14. Amostras dos testes realizados de acordo as diferentes cultivares e procedência, coletadas no CEASA, Uberlândia-MG. Uberlândia-MG, 2011.

Teste	Amostras	Cultivares	Procedência
1	1	Ágata	Araxá-MG
	2	Ágata	Araxá-MG
2	1	Ágata	Desconhecido
	2	Ágata	Desconhecido
3	1	Ágata	São Gotardo-MG
	2	Ágata	Patrocínio-MG
4	1	Ágata	Palmas-PR
	2	Ágata	Patrocínio-MG
5	1	Asterix	Palmas-PR
	2	Ágata	Araxá-MG
6	1	Asterix	Patrocínio-MG
	2	Ágata	Patrocínio-MG

As amostras foram avaliadas em dois tempos (12 e 24 horas) e em cinco temperaturas distintas (8°C, 18°C, 28°C, 38°C e 48°C), com 4 repetições de 6 tubérculos. Após o período de incubação, as amostras foram colocadas em baldes de plástico, contendo 2 litros da solução de percloroeto de ferro a 8,0% (conforme realizado na França – informação verbal)⁵ e imersos por 10 minutos. Em seguida, foram retiradas e deixadas em repouso sobre bandejas, por 20 minutos.

Os tubérculos foram avaliados de acordo a escala de notas determinada no Anexo A2 deste trabalho, variando de 0 a 4, onde: 0 – sem mancha escura; 1 - poucas manchas escuras (1-25% lesões com 1 mm de diâmetro); 2 – manchas escuras médias (26-50% lesões com 2 mm de diâmetro); 3 – manchas escuras entre as lenticelas (51-75% lesões de 3 a 5 mm de diâmetro) e 4–manchas escuras entre as lenticelas (76-100% lesões de 4 a 10 mm de diâmetro), inferindo o grau de dano físico e sanitário da amostra e o número de batatas podres que apareceram a cada tempo de incubação, buscando

⁵ Informação fornecida pela Associação Brasileira da Batata (ABBA) em 2009.

determinar um tempo ideal para que não haja o surgimento de bactérias devido à injúrias, indicado pelas notas.

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo ($2 \times 5 \times 2$), com dois tempos de avaliação: 12 e 24 horas, cinco temperaturas: 8°C, 18°C, 28°C, 38°C e 48°C, e duas amostras: 1 e 2, com quatro repetições, totalizando 80 parcelas, sendo cada uma representada por uma amostra com 6 tubérculos.

2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Normalidade (Shapiro Wilk) e Homogeneidade (Levene), verificando a variabilidade dos dados, e realizada a análise de variância para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos. Para a comparação das médias, aplicou-se o teste de F, a 5% de significância, e submetidas à análise do teste de Tukey. Para as análises, foram utilizados os programas estatísticos SPSS (NIE, 1975), para os testes de pressuposições, e SISVAR (FERREIRA, 2008), para os demais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indicação de pectobactérias por percloroeto de ferro em lotes comerciais de batata

Para os testes realizados nos tubérculos da cultivar Ágata, provenientes dos municípios de Araxá-MG (amostras 1 e 2, teste 1), CEASA-Uberlândia-MG (amostras 1 e 2, teste 2), Palmas-PR (amostra 1) e Patrocínio-MG (amostra 2), ambos do teste 4, não foi possível realizar uma análise estatística, pois de acordo os dados, as variâncias foram nulas.

Porém, visualmente, foi possível verificar de maneira em geral nestes testes que os tubérculos apresentaram notas maiores do que as do controle (3)- manchas escuras entre as lenticelas em temperaturas mais elevadas a partir dos 28°C. No momento que essa temperatura aumentava ficando próxima dos 38°C, os tubérculos iniciavam um processo de queima na estufa, isto ocorreu para ambos os tempos avaliados (12 e 24 horas).

Estes resultados também foram encontrados nos testes 3, 5 e 6. Foi observado também um maior número de batatas podres, quando incubados a 48°C e por 24 horas, conforme as figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Isto mostra uma relação direta entre tempos de avaliação e temperatura, em que quanto maiores for o tempo de exposição dos tubérculos em condições de altas temperaturas, maior será o seu apodrecimento, conseqüentemente maiores notas aparecerão. Fica evidente, neste caso, que tanto a qualidade sanitária, quanto o aspecto físico dos lotes são importantes, devendo levá-los em conta, pois, se há presença de bactérias, mesmo em estado latente, bem como danos mecânicos, o crescimento e desenvolvimento do patógeno pode ser favorecido.

Com base nestas observações, para que os tubérculos possam fazer longas viagens e fiquem armazenados, sugere-se que eles fiquem em condições de baixas temperaturas (18°C), para garantir o sucesso de entrega ao comprador, evitando perdas durante o trajeto das lavadoras até o consumidor final.



FIGURA 4. Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Araxá-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 12 horas a 28°C, Uberlândia-MG, 2011.



FIGURA 5. Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Araxá-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 38°C, Uberlândia-MG, 2011.



FIGURA 6. Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Araxá-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloreto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 48°C, Uberlândia-MG, 2011.



FIGURA 7. Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes do CEASA de Uberlândia-MG, origem desconhecida, após 10 minutos de imersão na solução de percloreto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 12 horas a 38°C, Uberlândia-MG, 2011.



FIGURA 8. Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes do CEASA de Uberlândia-MG, origem desconhecida, após 10 minutos de imersão na solução de perclorato de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 38°C, Uberlândia-MG, 2011.



FIGURA 9. Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Palmas-PR e Patrocínio-MG, após 10 minutos de imersão na solução de perclorato de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 12 horas a 48°C, Uberlândia-MG, 2011.



FIGURA 10. Tubérculos de batata cv. Ágata, provenientes de Palmas-PR e Patrocínio-MG, após 10 minutos de imersão na solução de percloroeto de ferro a 8%, avaliados aos 20 minutos após secagem e incubados por 24 horas a 48°C, Uberlândia-MG, 2011.

Com relação ao número de batatas podres, não houve diferença significativa entre os tubérculos provenientes de São Gotardo-MG e Patrocínio-MG, nos tempos de 12 e 24 horas de incubação (Tabela 15). Sendo, neste caso, indiferente o uso de um lote ou outro, na sua qualificação quanto ao número de tubérculos podres, uma vez que os fatores agem independentemente.

TABELA 15. Tubérculos de batata cv. Ágata provenientes de São Gotardo-MG e Patrocínio-MG, submetidos a diferentes tempos e temperaturas de incubação, na quantificação do número de batatas podres, Uberlândia-MG, 2011.

Tempo (horas)	Temperaturas (°C)	Número batatas podres	
		Amostras	
		São Gotardo-MG	Patrocínio-MG
12	Controle	1,0 aAa	1,0 aAa
	8	1,0 aAa	1,0 aAa
	18	1,0 aAa	1,0 aAa
	28	1,0 aAa	1,0 aAa
	38	1,0 aAa	1,0 aAa
	48	1,5 aBb	1,0 aAa
24	Controle	1,0 aAa	1,0 aAa
	8	1,0 aAa	1,0 aAa
	18	1,0 aAa	1,0 aAa
	28	1,0 aAa	1,0 aAa
	38	1,0 aAa	1,0 aAa
	48	1,0 aAa	1,0 aAa

DMS tempo = 0,16

DMS temperatura = 0,24

DMS amostras = 0,16

CV = 11,54%

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) **F= 1,213** (,309) e (Shapiro Wilk) **W= ,480** (,000), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Os tubérculos de batata das cultivares Asterix, provenientes de Palmas-PR e Ágata de Araxá-MG, não apresentaram diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 16).

TABELA 16. Tubérculos de batata cv. Asterix provenientes de Palmas-PR e cv. Ágata de Araxá-MG, submetidos a diferentes tempos, amostras e temperaturas na quantificação do número de batatas podres, Uberlândia-MG, 2011.

Tempo (horas)	Médias
12	1,0 a
24	1,02 a
Amostras	
Asterix Palmas-PR	1,0 a
Ágata Araxá-MG	1,02 a
Temperaturas (°C)	
Controle	1,0 a
8	1,0 a
18	1,0 a
28	1,0 a
38	1,0 a
48	1,06a
DMS tempo= 0,04	
DMS amostras= 0,04	
DMS temperatura= 0,10	
CV= 10,10%	

Médias seguidas por mesmas letras, não diferem pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) F= 7,039 (,000) e (Shapiro Wilk) W= 0,448 (,000), valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Baseado na Tabela 17, embora visualmente ambas as amostras estivessem ruins durante a montagem do experimento (dados não mostrados), a amostra da cv. Ágata, proveniente de Patrocínio-MG, foi a que apresentou os piores resultados em relação ao número de tubérculos podres; com uma podridão maior quando presente em temperaturas de 38°C (1,5) e 48° (1,25) (Figura 11), sendo esta não indicada ao armazenamento e transporte.

Já para a amostra da cultivar Asterix, não houve diferença significativa entre as temperaturas avaliadas. O ideal para armazenamento e transporte destes tubérculos avaliados deveria ser no máximo de 28°C, já que temperaturas mais elevadas são indesejáveis, devido ao surgimento de tubérculos podres (Tabela 17).

TABELA 17. Tubérculos de batata cvs. Asterix e Ágata provenientes de Patrocínio-MG submetidos a diferentes temperaturas e amostras, na quantificação do número de batatas podres, Uberlândia-MG, 2011.

Temperaturas (°C)	Número batatas podres	
	Amostras	
	Asterix Patrocínio-MG	Ágata Patrocínio-MG
Controle	1,0 aA	1,0 aA
8	1,0 aA	1,0 aA
18	1,0 aA	1,0 aA
28	1,0 aA	1,0 aA
38	1,0 aA	1,5 bB
48	1,0 aA	1,25bB

DMS temperatura = 0,29

DMS amostras= 0,20

CV = 19,21%

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste tukey a 0,05 de significância. (Levene) **F= 1,213 (,309)** e (Shapiro Wilk) **W= 0,480 (,000)**, valores em negrito indicam variâncias homogêneas e resíduos normalmente distribuídos a significância de 0,05, respectivamente.

Provavelmente, a ocorrência de podridão em tubérculos da cv. Ágata deve-se ao fato desta ser mais suscetível, quando comparada à Asterix.

Resultado semelhante foi encontrado para cv. Ágata, proveniente de São Gotardo-MG e Patrocínio-MG (teste 3), para as temperaturas de incubação, mostrando que as mais baixas são as mais indicadas durante o armazenamento e transporte.



FIGURA 11. Tubérculos de batata cv. Ágata com pontos de apodrecimento incubados a 38°C por 12 horas, após 10 minutos de imersão em solução de perclorato de ferro a 8%, 20 minutos após secagem, Uberlândia-MG, 2011.

Segundo os autores Elphistone (1987) e Lapwood; Gans (1984), existem perdas durante a estocagem de tubérculos de batata que são consideradas significativas de até 100%, sendo atribuídas à podridões causadas por bactérias do gênero *Pectobacterium*, em especial de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Dickeya chrysanthemi*. Jobling (2000) relatou que as perdas devido a impactos e danos físicos em batatas podem chegar até 40% na pós-colheita, com influências diretas no aumento da incidência de doenças, sendo associadas a esses danos físicos as podridões bacterianas (HENZ; BRUNE, 2004).

De maneira geral, as perdas estimadas de batatas no Brasil, variam de 0 a 100% (HENZ; BRUNE, 2004). Esta variação depende da cultivar usada, o processo delas durante o beneficiamento, ao local de instalação da cultura, a época do ano, etc. Sendo assim, pode-se dizer que as perdas possuem várias causas e dentre elas incluímos a

deterioração dos tubérculos (causada por patógenos), injúrias mecânicas, doenças (podridões), transporte inadequado, falta de aeração, beneficiamento pós-colheita impróprio, com destaque na lavagem e secagem, dentre outros.

Em conformidade, Martins e Farias (2002) apontam as perdas para estas mesmas causas e relatam que estas são normalmente as portas de entrada para invasões e crescimento de patógenos, ocasionando perda de peso, sabor, firmeza, mudança na coloração, sendo as injúrias mecânicas as principais causas de perdas na qualidade pós-colheita (CRISOSTO et al., 1997).

Desta forma, as causas das diferentes variações de perdas durante o ano, para qualquer produto hortícola, podem ser naturais e/ou provocadas. As causas naturais são atribuídas aos fatores climáticos, que podem acelerar a senescência dos produtos e favorecer o desenvolvimento dos patógenos causadores de apodrecimento. Assim, nos meses de verão, as ocorrências de altas temperaturas e elevadas taxas de umidade do ar criam as condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos e bactérias que contaminam os produtos. No período de inverno, as temperaturas mais baixas favorecem uma melhor conservação, retardando a maturação e a multiplicação de patógenos, proporcionando assim menor risco de contaminação (VILELA et al., 2003).

As perdas podem estar relacionadas também ao processo de limpeza nas lavadoras, provocando injúrias, e num segundo instante facilitando a penetração de bactérias. Fato este que somado a suscetibilidade dos lotes da cultivar Ágata e visto que todos passaram por este processo durante o beneficiamento, pode ter sido um dos fatores limitantes na má qualidade destes lotes estudados.

De acordo Alves (2011), o processo de lavagem das batatas apresenta desvantagens, pois além de acelerar a deterioração dos tubérculos causada por patógenos, ele aumenta a suscetibilidade ao esverdeamento quando armazenado. Outro ponto a ser considerado é a qualidade da água usada no processo de lavagem, que deve ser tratada ou proveniente de poço artesiano, evitando-se a água de rios e açudes que podem estar contaminadas. Evangelista e colaboradores (2011) também observaram o esverdeamento típico em todas as cultivares trabalhadas durante o armazenamento.

As temperaturas possuem importante papel no controle ao surgimento das *Pectobactérias*, pois de acordo Oliveira (2001), cada espécie ou subespécie possuem uma temperatura ótima de desenvolvimento indo desde 15°C a 37°C, abrangendo as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, as *P. carotovorum* subsp.

carotovorum e a *Dickeya chrysanthemi*. Sendo assim, durante o acondicionamento dos tubérculos, deve-se levar em conta as temperaturas no armazenamento e no transporte.

Condições ambientais, como umidade e temperatura, possuem grande influência no surgimento de doenças e extensão de danos causados. Segundo Smadja e colaboradores (2004), a severidade da podridão-mole provocada por estes agentes é dependente da temperatura. Para Martins e Farias (2002), condições de armazenamento, como temperatura e umidade relativa do ar, são fatores na pós-colheita que podem levar a perdas fisiológicas resultantes de fisiopatias. Para Ferreira e Netto (2007), as perdas ocorrem no transporte e principalmente no armazenamento inadequado de tubérculos.

Levando em conta as condições de transporte no nosso país, Caixeta Filho (1999) reporta que o mau estado de conservação das estradas brasileiras, associado às altas temperaturas que ocorrem no país, aceleram a deterioração, de forma que as perdas de produtos perecíveis, como hortaliças, podem chegar a 30%. E segundo Vilela e outros (2003), as perdas no transporte variam de acordo as estações do ano, sendo mais intensas nas épocas chuvosas. O cenário das malhas rodoviárias no país continua sendo motivo para perdas de produtos perecíveis.

Para Alves (2011), o transporte a longas distâncias, quando possível, deve ser feito em caminhões com lona térmica, organizando a carga permitindo uma aeração apropriada entre os sacos, evitando que aqueles localizados na parte inferior da carroceria fiquem excessivamente úmidos e quentes.

Segundo Parkin e Schwobe (1990), as batatas estão sujeitas à consideráveis perdas durante o armazenamento. Por isso, não é possível estocar, sem qualquer controle atmosférico, o excedente de uma boa safra de batatas para garantir o produto numa época de baixa produção. A fim de se controlar o fluxo de mercado e aumentar o período de conservação dos tubérculos, é necessário armazená-los em baixas temperaturas. Esse tipo de armazenamento aumenta a vida útil dos tubérculos e consequentemente traz qualidade ao produto final.

Para Martins e Farias (2002), o transporte e armazenamento inadequados são apontados como as causas de perdas altamente significativas nas cadeias produtivas. Assim, o armazenamento de cada produto deve ser feito segundo suas exigências e tolerâncias de temperatura, umidade relativa e circulação de ar nos armazéns ou câmaras frigoríficas. Em muitos casos, é aconselhável a realização de um pré resfriamento antes da armazenagem. Essa operação remove rapidamente o calor dos produtos perecíveis e sua temperatura fica próxima daquela que será utilizada durante o

período de armazenamento ou transporte. Alguns produtos são incompatíveis e não podem ser armazenados simultaneamente em câmaras frigoríficas ou armazéns. As utilizações do ar refrigerado devem ser contínuas ao longo de toda a pós-colheita até o consumidor final, o que permite a manutenção da qualidade dos produtos. No transporte, não sendo possível o uso de veículos refrigerados, as cargas devem ser protegidas com lonas limpas e de cores claras. É preciso garantir a circulação de ar, para evitar o abafamento e calor excessivo sobre as mercadorias. Hoje, já encontram-se batatas sendo transportadas em caminhões refrigerados.

De acordo Calbo (2011) apud Finger e Fontes (1999), no armazenamento de batatas para consumo, a temperatura ótima empregada deve ser a 10°C. Embora a vida útil dos tubérculos seja prolongada, é preciso atentar-se para a temperatura durante o armazenamento, pois temperaturas menores que esta aumentam a concentração de açúcares redutores, que caramelizam sob a ação do calor durante a fritura e deixam a batata frita escura, sendo que este efeito depende da cultivar (CALBO, 2011 APUD COELHO, 1998, KIM et al., 1993).

O armazenamento pode interferir no metabolismo dos tubérculos e, desta forma, Chapper e colaboradores (2004) determinaram, durante o armazenamento pós-colheita de tubérculos de batata entre 21°C e 28°C, que baixas temperaturas no armazenamento induzem aumentos nas atividades da invertase ácida e da amilase específicas, comprovando estas alterações metabólicas durante estocagem.

No armazenamento de batata-semente, temperaturas superiores ao ponto de congelamento -0,6°C e ao redor de 0°C são preferíveis, e durante o armazenamento da batata a umidade relativa deve ser superior a 90%. No entanto, deve-se evitar a ocorrência de condensação superficial de água causada pela supersaturação do ar. Temperaturas baixas atrasam a formação e o desenvolvimento dos brotos, reduzem a perda de água e aumentam a vida útil dos tubérculos (CALBO, 2011). Nakagawa e colaboradores (1995) afirmaram que em batata-semente o uso de temperaturas maiores de 28°C faz com que a ocorrência de podridões aumente muito, devido à temperatura e à transpiração.

Em concordância com os autores acima, Alves (2011) relata que em algumas situações o armazenamento refrigerado pode ser útil, sendo recomendado manter a batata a 0°C e numa umidade relativa entre 80 e 90%, com adequada ventilação, embora o uso de temperaturas abaixo de zero possam ocasionar acúmulo de sacarose e açúcares

redutores, o que é indesejável, pois torna a batata escura quando preparada na forma de fritas.

Várias medidas efetivas que reduzem estas perdas durante armazenamento e transporte já foram citadas, mas ainda há outras, como as relatadas por Henz e Brune (2004). Para esses autores realizar o ajuste de máquinas de beneficiamento, evitando ferimentos desnecessários nos tubérculos, para a batata lavada, ajustar a temperatura e a velocidade do vento do túnel de secagem, evitando danos excessivos a película dos tubérculos, usar de artifícios de refrigeração no armazenamento e outros são medidas alternativas.

Há também a aplicação de sais de cálcio, já relatada por diversos autores, tendo importante papel na redução de desordens fisiológicas, retardamento na senescência e inibição de podridões pós-colheita, uma vez que o cálcio tem habilidade em reduzir o desenvolvimento de doenças pós-colheita em frutos. Este procedimento ocorre pela ligação deste íon às pectinas presentes na parede celular do fruto, resultando no decréscimo da habilidade das enzimas pectolíticas produzidas pelo patógeno em degradar a parede celular, controlando a ação destes agentes patogênicos (GOMES et al., 2005 apud CONWAY ET AL, 1988, 1992; SHARPLES E JOHNSON, 1977). Gomes e outros (2005), trabalhando com cálcio e microrganismos para controle da podridão mole em tomate, conseguiram resultados positivos com a aplicação de antagonistas associados com soluções de cálcio, proporcionando uma redução considerável da podridão-mole em tomate, destacando a associação levedura/cálcio.

Os resultados de Yaganza e outros (2004), no efeito da aplicação de diferentes sais orgânicos e inorgânicos na qualidade de batatas armazenadas, corroboram com os outros autores, mostrando ser eficaz no controle de doenças.

Com relação à questão de resistência dos lotes da cultivar Asterix levantada neste trabalho em relação à podridão-mole, Benelli e outros (2004) também observaram isto, relatando que ela apresentou a menor suscetibilidade em relação a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, quando comparada às cultivares Achat, Baronesa e Monalisa; reforçando esta hipótese .

4 CONCLUSÕES

Temperaturas a partir de 28°C podem ser suficientes para a indicação da qualidade dos tubérculos de batata com uso da solução de percloroeto de ferro.

Temperaturas de 38°C ocasionam queima dos tubérculos em 12 e 24 horas de incubação.

Em temperaturas próximas a 48°C, ocorrem maior número de batatas podres.

REFERENCIAS

- ALVES, E. **Cultivo da batata. Transporte e Armazenamento**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/33021630/cultivo-da-batata>>. Acesso em 04 Nov. 2011.
- BENELLI, A.I.H., et al. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p.155-159, 2004.
- CAIXETA FILHO, J.V. Losses in the transportation of fruits and vegetables: A Brazilian case study. **International Journal of logistics: research and applications**, Bradford, v. 2, n. 3, 1999.
- CALBO, A. G. **Batata (*Solanum tuberosum*)**. 2011. Disponível em: <http://www.cnph.br/laborato/pos_colheita/batata.htm>. Acesso em 04 nov. 2011.
- CHAPPER, et al. Atividade amidolítica e de invertase ácida solúvel em tubérculos de batata armazenados sob duas condições de temperatura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.597-601, 2004.
- COELHO, A. H. R. Alterações químicas e qualidade de fritura de duas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) armazenadas em atmosfera modificada em temperatura ambiente e sob refrigeração. Lavras: **UFLA**. 145p; 1998.
- CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; MCGUIRE, R.G.; KELMAN, A. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.4, p.329-334, 1992.
- CONWAY, W.S.; et al. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, n.8, p.1052-1055, 1988.
- CRISOSTO, C. H.; JOHNSON, R. S.; DEJONG, T. Orchard factors affecting post harvest stone fruit quality. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 5, p. 820-823, 1997.
- ELPHISTONE, J.G. La pudrición blanca y la pierna negra de la papa *Erwinia* spp. Lima: CIP. **Boletín de Información Técnica**, Lima, n.21, 1987.
- EVANGELISTA, R. M.; et al. Qualidade nutricional e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.46, n.8, p.953-960, 2011.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FERREIRA, M. D; NETTO, L. H. Avaliação de processos nas linhas de beneficiamento e classificação de batatas. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 25, p. 279-285, 2007.

- FINGER, F.L.; FONTES, P. C. R. Manejo póscolheita da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, p. 105-111, 1999.
- GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.108-111, jan.-mar. 2005.
- HENZ, G.P. Situação da batata beneficiada no Distrito Federal em 1990 e 1991. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.1, p.46-49, 1993.
- HENZ, G. P; BRUNE S. Redução de perdas pós-colheita em batata para consumo. Brasília: **Embrapa** (Circular Técnica 34). 10 p, 2004.
- JOBLING J. Potatoes: handle with care. **Good Fruit and Vegetables Magazine**. North Richmond, v. 11, p. 34-35, 2000.
- KIM, H. O.; LEE, S. K.; SALTVEIT, M. E. Effects of curing and storage conditions on processing quality in potatoes. **Acta Horticulturae**, The Hague, Holanda, v. 343, p. 73-76, 1993.
- LAPWOOD, D. H.; GANS, P. T. A method for assessing the field susceptibility of potato cultivars to blackleg (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*). **Annals of Applied Biology**, Warwick, Inglaterra, v. 104, p. 315-320, 1984.
- MARTINS, C. R.; FARIAS, R. de M. Produção de alimentos X desperdício: Tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola- Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 20-32, 2002.
- NAKAGAWA, H.; et al. Effects of storage temperature of potato tubers on sprouting, respiration rate, sugar content, and polyphenol oxidase activity. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, Tokyo, v. 69, n. 3, p. 325-330, 1995.
- NIE, H. N. **SPSS: Estatistical Package for the Social Sciences**. Book. Publisher: New York, McGraw-Hill, 1975.
- OLIVEIRA, A. M. R. de. **Incidência e variabilidade genética de Erwinias Pectolíticas associadas à canela preta em lavouras de batata no Estado do Rio Grande do Sul**. 2001. 89 f. Tese (Doutorado – Fitossanidade).- Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- PARKIN, K. L.; SCHWOBE, M. A. Effects of low temperature and modified tmosphere on sugar accumulation and chip color in potatoes (*Solanum tuberosum*). **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.5, p.1341-1344, 1990.
- SHARPLES, R.O.; JOHNSON, D.S. The influence of calcium on senescence changes in apples. **Annals of Applied Biology**, Warwick, Inglaterra, v.85, p.450-453, 1977.

SMADJA, B.; et al. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Montreal, v. 50, p. 19–27, 2004.

VILELA, N. J.; LANA, M. M.; MAKISHIMA, N. O peso da perda de alimentos para a sociedade: o caso das hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 141-143, 2003.

YAGANZA, E.S.; ARUL, J.; TWEDDELL, R. J. Effect of pre-storage application of different organic and inorganic salts on stored potato quality. **Potato Research**, Wageningen, v. 46, p. 167-178, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que o percloroeto de ferro foi considerado ideal na qualificação dos tubérculos de batata apenas quanto à danos físicos., e na indicação da melhor temperatura para armazenagem e transporte por meio da escala de notas.

ANEXOS

Anexos A	Página
Anexo A1. Tabela de níveis de tolerância, em porcentagem de tubérculos atacados, para pragas não-quarentenárias regulamentadas, danos e misturas na batata-semente a ser produzida, importada e comercializada no país, segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.	09
Anexo A2. Amostras de batatas como critérios para aplicação de notas, Uberlândia-MG, 2009.	38
Anexo A3: Árvore decisória para identificação dos espécimes, segundo reações de PCR com diferentes pares e tríades de primers descritos na literatura.	51

Anexo A1. Tabela de níveis de tolerância, em porcentagem de tubérculos atacados, para pragas não-quarentenárias regulamentadas, danos e misturas na batata-semente a ser produzida, importada e comercializada no país.

PRAGAS, DANOS E MISTURAS	TOLERÂNCIA		
	CATEGORIA		
	BÁSICA	CERTIFICADA DE 1ª GERAÇÃO	CERTIFICADA DE 2ª GERAÇÃO
A – VIROSES			
PVX	2,0	3,0	5,0
PVY	3,0	6,0	8,0
PLRV	2,0	5,0	6,0
PVS	2,0	3,0	5,0
Limite:	4,0	8,0	12,0
B – RIZOCTÔNIA e SARNAS COMUM e PRATEADA			
<i>Rhizoctonia solani</i>			
- tubérculos acima de 1/8 da superfície atacada	2,0	3,0	5,0
- tubérculos abaixo de 1/8 da superfície atacada	20,0	20,0	20,0
- tubérculos com até 1/16 da superfície atacada	30,0	30,0	30,0
<i>Streptomyces</i> spp			
- tubérculos acima de 1/8 da superfície atacada	2,0	3,0	5,0
- tubérculos abaixo de 1/8 da superfície atacada	20,0	20,0	20,0
- tubérculos abaixo de 1/16 da superfície atacada	30,0	30,0	30,0
<i>Helminthosporium solani</i>			
- tubérculos acima de 1/8 da superfície atacada	2,0	3,0	5,0
- tubérculos abaixo de 1/8 da superfície atacada	20,0	20,0	20,0
- tubérculos abaixo de 1/16 da superfície atacada	30,0	30,0	30,0
C - OUTRAS PRAGAS			
Pulgão (número de pulgão)	0,0	0,0	0,0
<i>Ralstonia solanacearum</i>	0,0	0,0	0,0
<i>Spongopora subterranea</i>	0,0	1,0	1,0
<i>Fusarium solani</i> (tipo <i>eumartii</i>)	0,0	0,0	0,0
<i>Phytophthora infestans</i>	1,0	3,0	5,0
<i>Erwinia</i> spp	1,0	1,0	2,0
<i>Meloidogyne</i> spp (Nematóides de galha)	1,0	1,0	2,0
<i>Fusarium</i> spp	2,0	2,0	3,0
<i>Alternaria</i> spp	3,0	5,0	7,0
<i>Cylindrocladium</i> spp	2,0	2,0	3,0
<i>Pratylenchus</i> spp (Nematóides das lesões)	1,0	1,0	2,0
Limite:	7,0	8,0	10,0
D - DANOS CAUSADOS POR INSETOS			
Traça (<i>Phthorimaea operculella</i>)	2,0	3,0	5,0
Danos causados por outros insetos	5,0	7,0	10,0
Limite:	5,0	7,0	10,0
E - DANOS FISIOLÓGICOS			
E.1 - Embonecamento, fendas, coração oco, coração preto, mancha chocolate (mancha interna)	10,0	12,0	15,0
E.2 - Tubérculo vitrificado, broto fino, dano de desfolhante, Deficiência de cálcio, queimadura (cozimento de sol)	3,0	4,0	5,0
Limite:	10,0	12,0	15,0
F - DANOS MECÂNICOS			
(batidas, cortes e esfolamento)	5,0	10,0	10,0
Limite:	5,0	10,0	10,0

“Anexo A1, Cont.”

G – MISTURAS			
G.1 - Mistura Varietal	0,0	1,0	2,0
G.2 - Mistura de Tamanho	5,0	5,0	5,0
Limite:	5,0	5,0	5,0

Anexo A2. Amostras de batatas como critérios para aplicação de notas, Uberlândia-MG, 2009.



Nota 0 – sem mancha escura



Nota 1 - poucas manchas escuras
(1-25% lesões com 1 mm de diâmetro)



Nota 2 – manchas escuras médias
(26-50% lesões com 2 mm de diâmetro)



Nota 3 – manchas escuras entre as
lenticelas (51-75% lesões de 3 a 5 mm
de diâmetro)



Nota 4–manchas escuras entre
as lenticelas (76-100% lesões de 4
a 10 mm de diâmetro)

Anexo A3: Árvore decisória para identificação das subespécies de *Pectobacterium* spp., segundo reações de PCR com diferentes pares e tríades de primers descritos na literatura.

