MARIA FERNANDA DA SILVA FIDALGO FERRO DE BEÇA



TRATAMENTOS DE BATATEIRAS COM AGROQUÍMICOS

Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo

Maria Fernanda da Silva Fidalgo Ferro de Beça

Instituto de Botânica, Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

TRATAMENTOS DE BATATEIRAS COM AGROQUÍMICOS

Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo

PORTO
1995

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção do grau de Doutor, de acordo com o disposto no nº 1 do art. 8 do Dec.-Lei 388/70, de 18 de Agosto.

Orientador - Doutora Isabel Santos
Professor Catedrático da Fac. Ciências do Porto

Este trabalho foi parcialmente subsidiado pela JNICT, através do Projecto nº 822.86.32/Bio "Aspectos Fisiológicos de Efeitos de Produtos Antimicóticos na Célula Vegetal em Sistemas *in vivo* e *in vitro*".

A meus filhos,
Francisco e Mariana

De acordo com o disposto no nº 2 do Dec.-Lei nº 338/70 foram utilizados, para a elaboração desta dissertação, dados apresentados nos seguintes trabalhos:

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Biochemical and ultrastructural aspects of field grown potato plants (*Solanum tuberosum* L.) treated with mancozeb. *Bol. Soc. Brot.* **64**: 81-98 (1991).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Effects of deltamethrin on field grown potato plants: biochemical and ultrastructural aspects. *Ann. Bot.* **72**: 263-267 (1993).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Biochemical aspects of tubers from potato plants treated with decis® or ridomil®. *Anais da Fac. de Ciências* (em publicação).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Callus tissue of *Solanum tuberosum* L. cultured in the presence of the agrochemical Decis®. (submetido para publicação).

e nas seguintes comunicações:

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Effects of ridomil on plants of *Solanum tuberosum* L. *Ciência Biológica - Molecular and Cellular Biology* **14**: 207-208 (1989).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Effect of mancozeb on *Solanum tuberosum* L.: ultrastructural and biochemical aspects. *Ciência Biológica - Molecular and Cellular Biology* **15**: 72 (1990).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Respostas Ultraestruturais e Bioquímicas de *Solanum tuberosum* L. tratada com produtos fitofarmacêuticos. *VI Col. Nac. Prod. Batata-I Encontro Luso-Espanhol de Batata* (1991).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Biochemical aspects of field grown potato plants treated with ridomil. *IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress* (1991).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Effects of deltamethrin field treatments on *Solanum tuberosum* L.*Ciência Biológica - Molecular and Cellular Biology* **16**: 79-80 (1991).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Behaviour of callus tissue of *Solanum tuberosum* L. grown with deltamethrin. *Ciência Biológica - Molecular and Cellular Biology* **17**: 12 (1992).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Aspectos bioquímicos de tubérculos de plantas de *Solanum tuberosum* L. tratadas com Decis® e Ridomil MZ 72®. *Jorn. Estrut. Metab. e Desenv. em Plantas (Soc. Portug. Bioq.)* (1993).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Response of field grown potato plants to the fungicide mancozeb. *XXIX Reunião Anual da SPME & BC* (1994).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Redutases do nitrato e do nitrito, proteínas totais e NO_3^- em plantas de batateira tratadas com Decis®. *IV Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal - XI Reunión Nacional de La Sociedad Española de Fisiologia Vegetal* (1995).

Fidalgo, F., Santos, I. & Salema, R. - Effects of Ridomil® MZ 72 on callus tissue of *Solanum tuberosum* L. *XXX Reunião Anual da SPME & BC* (1995).

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese só foi possível com a colaboração de várias pessoas e instituições a quem gostaria de expressar os meus agradecimentos.

As primeiras palavras de agradecimento têm que ser dirigidas à Senhora Professora Isabel Santos, não apenas como decorrência de ter sido a orientadora dos trabalhos subjacentes a esta tese, mas pelo muito que a ela devo na minha formação científica. Acresce, ainda, que para além desses valiosos ensinamentos sempre encontrei completa disponibilidade para analisar o trabalho que ía realizando e sempre que necessário recebi o apoio e encorajamento que, em algumas ocasiões, tão importante foi. Para além disto tudo, o exemplo que a Professora Isabel Santos sempre patenteou, para mim e para todos os outros, constitui valiosa perspectiva que me dirigiu e motivou. Além de tudo isto, há, ainda, a confiança que em mim depositou e que me criou um melhor sentido de responsabilidade para com o meu trabalho e fez surgir elevada consideração e sincera amizade.
Ao Senhor Professor Doutor Roberto Salema expresso o meu profundo reconhecimento pelo seu estímulo, sugestões, consideração e amizade sempre demonstradas e desejo especialmente agradecer pelos ensinamentos como Professor e Investigador.

À Professora Dra. Arlete Santos e Dr. José Manuel de Almeida, manifesto a minha gratidão pela amizade, apoio e sugestões prestadas ao longo destes anos de simpática convivência.
À Dra. Angélica Carreiro desejo agradecer pelo agradável convívio e companheirismo e, sobretudo, pela amizade que me tem demonstrado.

O meu sincero obrigado a todos os que trabalham no Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto e que contribuíram de algum modo para a realização desta tese. Gostaria de agradecer especialmente à Sra. D. Maria Andréa Costa pela disponibilidade e paciência na realização das fotografias e, à Sra. D. Isabel Guimarães, pela dedicação e

cuidados que tem tido na manutenção da cultura de tecido caloso. A ambas, quero também agradecer a amizade que me têm dispensado.

Ao Engenheiro Camilo Pinho, um agradecimento muito especial pela disponibilidade e amizade demonstradas e pela valiosa colaboração prestada na realização dos trabalhos de campo.

O meu agradecimento à Dra. Teresa Serra pela disponibilidade manifestada para as determinações de zinco e manganésio, com o espectrofotómetro de absorção atómica.

À Comissão Directiva do Instituto de Botânica "Dr. Gonçalo Sampaio", na pessoa do seu Presidente e, à Direcção do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, os meus agradecimentos pelas facilidades e apoios concedidos.

À Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro-e-Minho quero expressar os meus agradecimentos pela disponibilidade e facilidades proporcionadas ao longo de vários anos na utilização dos terrenos da Quinta de S. Gens, na Unidade de Exploração Agrícola da Senhora da Hora (Matosinhos). Desejo também agradecer, não só a disponibidade de pessoal para a realização das plantações e das adubações sempre que foi necessário, mas também o apoio técnico para a análise de nutrientes inorgânicos do solo e realização dos tratamentos fitossanitários.

Finalmente, ao meu marido, quero agradecer pela constante disponibilidade, estímulo, sugestões e preciosa ajuda a que já me acostumou e, também pela paciência que para comigo sempre demonstrou, durante a realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho pretendeu-se estudar certos aspectos do comportamento fisiológico de plantas de batateira (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) crescidas no campo, em resposta a aplicações de agroquímicos correntemente utilizados na prática agrícola desta importante cultura e analisar as eventuais repercussões desses tratamentos na qualidade dos tubérculos e também na produtividade. Seleccionaram-se dois fungicidas, um de contacto (Shell Mancozebe® 80) e um sistémico (Ridomil® MZ 72), normalmente utilizados no controlo do fungo responsável pela doença do míldio e, um insecticida (Decis®), regularmente empregue no combate ao escaravelho da batateira. Para avaliar o grau de correlação existente entre a resposta das plantas aos tratamentos com os agroquímicos e a do tecido caloso, foram feitos estudos semelhantes utilizando uma cultura estabelecida de tecido caloso proveniente do mesófilo de *S. tuberosum*.

O estudo do comportamento das três vias metabólicas - redução do azoto inorgânico, fotossíntese e respiração - através da quantificação da actividade de enzimas e do consumo de O_2, mostrou que a aplicação dos agroquímicos provocava alterações nos vários parâmetros analisados.

O Decis® teve efeito positivo no teor de clorofilas, proteínas e ião nitrato e, também, na actividade de enzimas das referidas vias metabólicas (ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase, nitrato redutase e nitrito redutase), permitindo uma maior longevidade das plantas. Comportamento diferente foi manifestado pelas plantas tratadas com Ridomil® MZ 72 ou com Shell Mancozebe® 80, pois os parâmetros bioquímicos avaliados ou não eram afectados ou eram-no negativamente. A actividade respiratória era também estimulada pelo Decis®, não se observando qualquer variação em resposta à aplicação dos fungicidas. Estes provocaram acumulação dos iões zinco e manganésio, que surgia superior nas plantas tratadas com Ridomil® MZ 72, provavelmente, devido ao facto de ser um fungicida sistémico.

As aplicações dos agroquímicos não provocaram alterações profundas na ultraestrutura das células do mesófilo, no entanto, principalmente a nível dos cloroplastos foram

encontradas algumas diferenças. No material tratado com Decis®, as alterações mais evidentes era a diminuição da quantidade de amido e um maior número de tilacóides nos grana e, no tratado com os fungicidas, alterações que se caracterizavam pelo aparecimento de dilatação dos tilacóides granares e intergranares.

O tratamento das plantas com os fungicidas teve consequências negativas no valor nutricional dos tubérculos, que mostravam um menor teor de amido e de proteínas, provocando o Shell Mancozebe® 80 efeitos menos acentuados do que os do Ridomil® MZ 72. Este fungicida sistémico provocava, também, acumulação dos iões zinco e manganésio. O efeito estimulante do Decis nos vários parâmetros bioquímicos analisados a nível foliar, tiveram repercussão positiva na qualidade nutricional dos tubérculos, que se manifestou por um mais elevado teor de amido e também a produtividade (t/ha) surgiu aumentada.

Os resultados obtidos com o tecido caloso crescido na presença de Decis® ou de Ridomil® MZ 72, quer a nível bioquímico, quer a nível ultraestrutural, mostraram que o comportamento deste sistema *in vitro* é semelhante ao das plantas crescidas no campo, relativamente a alguns dos parâmetros estudados. No caso do Decis®, em particular, observou-se um elevado grau de correlação entre a resposta do tecido caloso e a das plantas.

Na continuação deste trabalho, procurar-se-á fazer a quantificação da proteína enzimática ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase, quantificação da actividade das enzimas responsáveis pela assimilação do amónio, bem como, estudar o possível envolvimento de algumas fito-hormonas na resposta das plantas tratadas com os agroquímicos. Atendendo à importância da cultura de *S. tuberosum* é de grande interesse obter conhecimento sobre o processo de partição dos hidratos de carbono, quer usando uma metodologia clássica, quer recorrendo a técnicas de biologia molecular. Nos tubérculos, será também importante a identificação dos aminoácidos nas diferentes situações experimentais. De modo a aumentar a aplicabilidade do sistema *in vitro* será bastante útil conseguir que o tecido caloso tenha a capacidade de crescer fotoautotroficamente.

ABSTRACT

The present study focused on some aspects of the physiological responses of field grrown potato plants (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) treated with agrochemicals commonly used in agriculture practice, including their effects on the nutritional quality of the tubers and in the plant´s productivity as well. Two fungicides were used, one with contact action (Shell Mancozebe® 80) and the other with systemic action (Ridomil® MZ 72), both currently used to control the fungus responsible for the potato late blight disease; an insecticide (Decis®), locally used to control Colorado potato beetle, was also used. An established callus tissue culture, derived from mesophyll tissue of *S. tuberosum* was used as model system to complement the study, by evaluating the degree of correlation between its behaviour and that of the plants when both were comparably treated with the same agrochemicals.

Through enzymatic activity quantification and O_2 uptake, the conclusion was drawn that the three metabolic pathways considered - inorganic nitrogen reduction, photosynthesis and respiration - appeared altered in all parameters that were considered.

Decis® had a positive effect on the levels of chlorophyll, protein and nitrate ions, as well as also on the activity of enzymes of the above referred to metabolic pathways such as ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase, nitrate reductase and nitrite reductase, leading to an extended life cycle of the plants. Differently, plants treated with Ridomil® MZ 72 or with Shell Mancozebe® 80, had the studied biochemical parameters negatively affected, or not affected at all. The rate of O_2 uptake was increased by Decis® treatment but remained unchanged after the application of the fungicides. However, these latter caused accumulation of zinc and manganese ions, more intense after Ridomil® MZ 72 application, probably due to its systemic character.

The application of the agrochemicals did not cause deep ultrastructural alterations in the mesophyll cells, although some differences appeared, mainly in the chloroplasts. In material treated with Decis® the diminution of the starch content was significant and higher number of thylakoids per granum were found; plants treated with the fungicides had grana and stroma lamellae swollen.

Treatment with the fungicides was detrimental to the nutritive value of the tubers, which showed a lowered contents of both starch and proteins, more so with Ridomil® MZ 72 than with Shell Mancozebe® 80. Ridomil® MZ 72 also caused accumulation of zinc and manganese ions in the tubers. Contrary to that, treatment with Decis® had beneficial effects on the tubers, which showed higher starch levels and also enhanced the productivity of the plants (t/ha), possibly in relation with the enhanced biochemical parameters quantified in the leaves.

Data obtained with callus tissue system cultured in the presence of Decis® or Ridomil® MZ 72, showed similarities with the results of the *in vivo* treatments, either at the biochemical or ultrastructural level. The degree of correlation between the responses of the callus tissue culture and that of the plants was particularly high in the case of treatments with Decis®.

Future avenues of research can include biochemical determination of the amount of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase protein, quantification of the activity of ammonium assimilating enzymes, as well as the study of the possible involvement of some phytohormones on the physiological responses of potato plants to agrochemical treatments. Due to the importance of *S. tuberosum* as crop species, the study of the carbohydrate partitioning is very important, using both classical physiological methodology and molecular biology techniques. Since variation on the amount of amino acids in the tubers was found, their identification and response to treatments should be studied. To further exploit the applicability of the *in vitro* system, growth conditions for maintenance of autotrophic callus cultures have to be worked out.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, on a cherché d'étudier certains aspects du comportement physiologique des plantes de la pommme de terre (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) grandies dans le champ, en réponse a des applications d'agrochimiques couramment utilisés dans la pratique agricole de cette importante culture, et d'analyser les répercussions éventuelles de ces traitements dans la qualité des tubercules et aussi dans la productivité. On a sélectionné deux fongicides, l'un de contacte (Shell Mancozebe® 80) et l'autre systémique (Ridomil® MZ 72), utilisés d'habitude dans le contrôle du fongus responsable de la maladie du mildiou, et un insecticide (Decis®), employé régulièrement dans le combat au scarabée de la pomme de terre. Pour évaluer le degré de corrélation existant entre la réponse des plantes aux traitements avec les agrochimiques et celle du tissu calleux, des études semblables ont été faites en utilisant une culture établie de tissu calleux provenant du mésophyle de *S. tuberosum*.

L'étude du comportement des trois voies métaboliques - réduction de l'azote inorganique, photosynthèse et respiration - à travers de la quantification de l'activité de quelques enzymes et de la consommation d'O_2, a montré que l´application des agrochimiques provoquait des altérations dans les divers paramètres analysés. Le Decis® a eu un effet positif dans le teneur de chlorophylles, protéines et ion nitrate et, aussi, dans l'activité d'enzymes des susdites voies métaboliques (ribulose bisphosphate carboxylase/oxygénase, nitrate réductase et nitrite réductase), permettant une plus grande longévité des plantes. Un comportement différent a été révélé par les plantes traitées avec du Ridomil® MZ 72 ou avec Shell Mancozebe® 80, car les paramètres biochimiques évalués ou pas étaient affectés ou l'étaient d'une façon négative. L'activité respiratoire était aussi stimulée par le Decis®, ne s'observant aucune variation en réponse à l'application des fongicides. Ceux-ci ont provoqué une accumulation des ions zinc et manganèse, qui surgissait supérieur dans les plantes traitées avec du Ridomil® MZ 72, probablement dû au fait d'être un fongicide systémique. Les applications des agrochimiques n'ont pas provoqué d'altérations profondes dans l'ultrastructure des cellules du mésophylle,

cependant, surtout au niveau des chloroplastes, quelques différences ont été trouvées. Dans le matériel traité avec du Decis®, les altérations plus évidentes étaient la diminution de la quantité d'amidon et un nombre plus grand de thylacoïdes dans les grana et, dans celui traité avec les fongicides, des altérations qui se caractérisaient par l'apparition de dilatation des thylacoïdes granaires et intergranaires. Le traitement des plantes avec les fongicides a eu des conséquences négatives dans la valeur nourricière des tubercules, qui montraient un moindre teneur d´amidon et de protéines, le Shell Mancozebe® 80 provoquant des effets moins accentués que ceux du Ridomil® MZ 72. Ce fongicide systémique provoquait aussi une accumulation des ions zinc et manganèse. L'effet stimulant du Decis® dans les divers paramètres biochimiques analysés au niveau foliaire a eu une répercussion positive dans la qualité nourricière des tubercules, ce qui s'est révélé par un teneur d'amidon plus haut, la productivité (t/ha) ayant aussi apparu augmentée.

Les résultats obtenus avec le tissu calleux grandi dans la présence du Decis® ou du Ridomil® MZ 72, soit au niveau biochimique, soit au niveau ultrastructurale, ont montré que le comportement de ce système *in vitro* est pareil au des plantes grandies dans le champ, en rapport avec quelques paramètres étudiés. Dans le cas du Decis®, en particulier, on a observé un grand degré de corrélation entre la réponse du tissu calleux et celle des plantes.

Dans la continuation de ce travail, on cherchera faire la quantification de la protéine enzymatique ribulose bisphosphate carboxylase/oxygénase, quantification de l'activité des enzymes responsables pour l'assimilation de l'ammonium, ainsi que, étudier le possible rôle de quelques phytohormones dans la réponse des plantes traitées avec des agrochimiques. En attendant à l'importance de la culture de *S. tuberosum,* est d'un grand intérêt obtenir du connaissance sur le procès de la répartition des hydrates de carbone, soit usant une méthodologie classique, soit se servant des techniques de biologie moléculaire. Dans les tubercules, il sera aussi important l'identification des aminoacides dans les différentes situations expérimentales. À la façon d'augmenter l'applicabilité du système *in vitro* il sera assez utile que le tissu calleux ait la capacité de grandir de une manière autotrophique.

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amónio
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
dae	Dias após emergência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo) tetraacético
E.P.	Erro padrão
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GDH	Desidrogenase do glutamato
GS	Glutamina sintetase
GOGAT	Glutamato sintase
Hepes	4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-ácido etanosulfónico
i.a.	Ingrediente activo
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Na_2-EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético disódico
NAD	Nicotinamina adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamina adenina dinucleótido (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
β-NADP	β-Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato
NiR	Nitrito redutase
NPTL	Naftiletilenodiamina
NR	Nitrato redutase
p.c.	Produto comercial
PIPES	1,4-piperazina-bis (ácido etanosulfónico)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
PVP	Polivinilpirrolidona
RuBisCo	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
SFA	Sulfanilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tricina	N-tris (hidroximetil) metilglicina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. A batateira 1

Características da planta 1

Local de origem e importância económica 3

O míldio e o escaravelho da batateira 5

Valor nutricional do tubérculo 8

1.2. Interdependência entre metabolismo do azoto, fotossíntese e respiração 9

1.3. Interacção "fonte"-"recebedor" 31

1.4. Tuberização 33

Formação e crescimento dos tubérculos 33

Factores que controlam a tuberização 35

Efeito das fito-hormonas na tuberização 36

Influência da nutrição azotada na formação e crescimento do tubérculo 38

Síntese de amido 41

Acumulação de proteínas de reserva 45

1.5. Culturas *in vitro* de *S. tuberosum* L. 45

1.6. Objectivos 53

2. MATERIAL E MÉTODOS 57

2.1. Material 57

2.2. Localização e arranjo das parcelas de terreno 57

2.3. Preparação do terreno, plantação e cuidados culturais 58

2.4. Tratamentos fitossanitários 59

2.5. Colheita de material foliar 61

2.6. Estudos em folhas 63

Determinações bioquímicas 63

Clorofilas 63

Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo; EC 4.1.1.39) 64

Proteínas 65

Nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1) 66

Nitrito redutase (NiR; EC 1.7.7.1) 66

lão nitrato 67

Actividade respiratória 67

Zinco e Manganésio 68
Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 69
Microscopia electrónica de transmissão 70
Análise morfométrica ultraestrutural 71
2.7. Colheita de tubérculos 71
2.8. Estudos em tubérculos 72
Determinações bioquímicas 72
Proteínas totais 72
Aminoácidos 72
Amilose/Amilopectina 73
ADP-glucose pirofosforilase (EC 2.7.7.27) 74
Amido 75
Zinco e Manganésio 76
2.9. Cultura de tecido caloso 76
Indução e estabelecimento da cultura de tecido caloso 76
Preparação dos meios de cultura suplementados com Decis® ou Ridomil® MZ 72 78
2.10. Estudos em tecido caloso 79
Determinações bioquímicas 81
Proteínas 81
Clorofilas 81
Nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1) 81
Nitrito redutase (NiR; EC 1.7.7.1) 82
Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 82
Microscopia electrónica de transmissão 82
2.11. Análise estatística 82

3. RESULTADOS 83
3.1. Estudos em folhas 83
Desenvolvimento das plantas 83
Determinações bioquímicas 85
Clorofilas 85
Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo; EC 4.1.1.39) 87
Proteínas 91
Nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1) 97
Nitrito redutase (NiR; EC 1.7.7.1) 99

lão nitrato 101
Actividade respiratória 103
Zinco e Manganésio 105
Estudo ultraestrutural 108
Análise morfométrica ultraestrutural 117
3.2. Estudos em tubérculos 121
Determinações bioquímicas realizadas aos 33 e 77 dae 121
ADP-glucose pirofosforilase (EC 2.7.7.27) 121
Amido 123
Determinações bioquímicas realizadas no fim do ciclo cultural 125
Produção de tubérculos 128
3.3. Estudos em tecido caloso 129
Cultura estabelecida de tecido caloso 129
Determinações bioquímicas 131
Proteínas 131
Clorofilas 140
Nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1) e Nitrito redutase (NiR; EC 1.7.7.1) 140
Observações ultraestruturais 141

4. DISCUSSÃO 145
4.1. Estudos em folhas 145
4.2. Estudos em tubérculos 164
4.3. Estudos em tecido caloso 172

5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES 177

6. BIBLIOGRAFIA 186

1. INTRODUÇÃO

1.1. A batateira

Características da planta

A batateira, cuja designação botânica é *Solanum tuberosum* L., inclui-se na família Solanaceæ. Desta família fazem parte outras plantas cultivadas, bem conhecidas, como a beringela (*S. melongena* L.), o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) e o pimenteiro (*Capsicum* L.). O número de espécies do género *Solanum* é bastante elevado, tendo sido já identificadas mais de 2000 espécies (Hawkes 1978; Burton, 1989).

S. tuberosum é uma planta anual, embora, potencialmente, possa considerar-se perene, devido à sua capacidade de reprodução vegetativa através de tubérculos subterrâneos. A reprodução da planta a partir da semente não é geralmente praticada, sendo particularmente útil, em estudos na área da genética (Cutter, 1992).

As plantas que crescem a partir dos tubérculos possuem um sistema radicular fibroso, formado por raízes adventícias. Nas fases iniciais do crescimento, as raízes desenvolvem-se junto da camada superior do solo e, após terem crescido horizontalmente, podem atingir alguma profundidade no terreno de cultura. As folhas da planta com inserção helicoidal, são compostas, imparipinuladas, surgindo entre os folíolos principais pequenos folíolos

adicionais. A parte aérea do caule é herbácea, erecta nas primeiras fases do desenvolvimento mas, mais tarde, torna-se parcialmente prostrada; os caules são triangulares ou quadrangulares em secção transversal e normalmente de cor verde ou violácea. A porção subterrânea do caule, que possuí folhas rudimentares, é ramificada, desenvolvendo-se na sua extremidade os tubérculos. De acordo com Cutter (1992), morfologicamente, um tubérculo é um caule modificado (rizoma), com entre-nós muito distendidos no plano radial, com folhas escamiformes rudimentares, dispostas helicoidalmente, possuindo cada folha um gomo axilar. Os gomos agrupam-se em "olhos", sendo cada "olho" de um tubérculo formado por uma folha rudimentar expandida tangencialmente protegendo um gomo axilar e por dois primórdios foliares (à direita e à esquerda da axila da folha rudimentar) com os respectivos gomos axilares (Cutter, 1992; Fig. 1). Na região basal do tubérculo podem encontrar-se restos do rizoma ou a sua cicatriz, designando-se esta zona por hilo, enquanto que a região oposta a esta é denominada coroa.

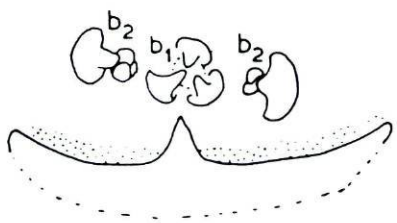


Fig. 1 - Esquema de um "olho" de um tubérculo, com uma folha rudimentar expandida tangencialmente protegendo um gomo axilar (b_1) e dois primórdios foliares (à direita e à esquerda da folha rudimentar), eles próprios protegendo gomos axilares (b_2). Adaptado de Cutter (1992).

As flores agrupadas em cimeiras, são pentâmeras; os estames, que possuem anteras com deiscência poricida terminal, dispõem-se à volta do pistilo. Este é constituído por um ovário

súpero, sincárpico e biloculado, um longo estilete e um estigma bilobado (Cutter, 1992). Os frutos, são bagas com cerca de 1 a 3 cm de diâmetro, geralmente de cor verde tornando-se de cor avermelhada quando maduros; possuem dois compartimentos e podem conter cerca de 200-300 sementes (Hooker, 1986).

Local de origem e importância económica

Embora não existam dúvidas de que a batateira que se encontra na Europa pertence à espécie *Solanum tuberosum* L. e que é nativa da América do Sul, existem algumas dúvidas àcerca do local exacto de origem. Não se sabe, com certeza, se as primeiras batatas trazidas para a Europa foram plantas de *S. tuberosum* L. subespécie *tuberosum* provenientes do Chile ou da subespécie *andigena* originária dos Andes; todavia existe algum consenso de opinião, de que as primeiras plantas que vieram para o velho continente eram da subespécie *andigena* e, portanto, provenientes das terras altas do Sul da América (Burton, 1989; Hawkes, 1992). A planta apareceu na Europa durante o último quartel do século XVI, porém não se conhecem informações seguras sobre a sua introdução e difusão neste continente (Hawkes, 1992; Ferrão, 1992). Salaman (1937) refere que a batateira foi introduzida em Espanha em 1570 e deste país foi difundida por toda a Europa, essencialmente como curiosidade botânica, tendo sido apenas cultivada para fins alimentares em meados do século XVIII (Hawkes, 1992). Existem referências de uma outra "introdução" da batateira em Inglaterra, em 1590, provavelmente a partir de tubérculos transportados em barcos espanhóis, provenientes da América e capturados por marinheiros ingleses (Hawkes, 1992; Ferrão, 1992) (Fig. 2).

No que se refere a Portugal, não são rigorosas as informações, quer sobre a introdução da planta, quer sobre o início da sua cultura. Hawkes (1992), afirma que a introdução da batateira no nosso País deverá ter sido anterior a 1587; no entanto, segundo Leite de Vasconcellos (1936), a primeira vez que um lexicógrafo português se refere à planta data de 1647, no "Thesouro da Língua Portuguesa", de Bento Pereira. As primeiras obras portuguesas sobre a cultura da batata surgiram em meados do século XIX, sendo de 1845, o "Manual Prático da Cultura das Batatas e do seu Uso na Economia Doméstica", do

Visconde de Vilarinho de S.Romão, publicado pela Academia Real das Ciências de Lisboa (Guerreiro, 1987), facto que pressupõe que a cultura desta planta tinha já alguma importância no nosso País; a batata começou a substituir gradualmente a castanha na alimentação humana, daí as designações de castanholas e castanhas da terra como eram frequentemente referidas em certas regiões do País (Guerreiro, 1987).

Actualmente a batateira, cultivada em mais de 70% dos países, é uma das principais culturas mundiais, ocupando a área total de cerca de 18 milhões de hectares por ano (FAO, 1993). A produção anual de batata situa-se em quarto lugar depois do trigo, arroz e milho, com a produção aproximada de 270 milhões de toneladas em 1992 (FAO, 1993), constituindo a cultura não cerealífera mais importante na alimentação humana. Nas últimas décadas, a produção de batata tem-se deslocado dos países desenvolvidos para os países em desenvolvimento e, das zonas temperadas para as tropicais e subtropicais (Horton & Anderson, 1992).

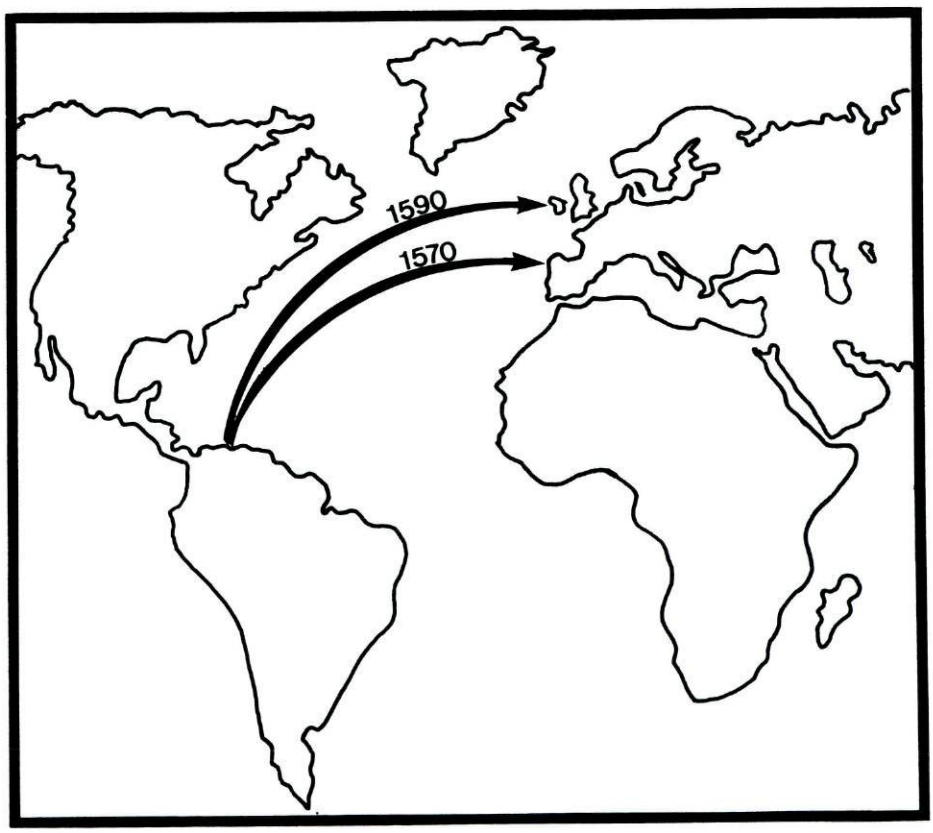


Fig. 2 - Local de origem da batateira e datas da sua introdução na Europa. Adaptado de Ducreux *et al.* (1986).

No nosso País a batata tem uma grande importância social e económica e desempenha um papel significativo na dieta alimentar dos portugueses (Portas, 1983). De acordo com os dados disponíveis do Instituto Nacional de Estatística, a produção média nacional no quinquénio de 1988/1992 foi de cerca de 1 341 000 toneladas, com um consumo *per capita* em 1992 de 135,6 kg (INE, 1994). As condições climáticas mais favoráveis ao crescimento e desenvolvimento da batateira encontram-se no Norte de Portugal (Portas, 1983), localizando-se cerca de 64% da produção nacional nas regiões agrícolas da Beira Litoral, Entre-Douro-e-Minho e Trás-os-Montes (Martins, 1990).

O míldio e o escaravelho da batateira

A viabilidade económica da cultura é limitada por muitos tipos de situações adversas a que a planta está exposta, particularmente à acção de agentes bióticos; a incidência e intensidade de doenças e pragas podem afectar acentuadamente o sucesso do cultivo da batata, podendo mesmo levar à destruição completa da cultura. Os agentes patogénicos podem atacar as folhas, o sistema radicular e os tubérculos, de modo que as doenças podem ser importantes durante todo o ciclo de vida da planta. De uma maneira em geral e, não considerando qualquer efeito no armazenamento dos tubérculos, de acordo com Burton (1989), a doença pode reduzir a produção, de quatro modos: causando a morte prematura das folhas da planta; atrofiando o desenvolvimento da planta, reduzindo consequentemente a capacidade fotossintética; interrompendo o transporte dos produtos da fotossíntese para os tubérculos, ou provocando o apodrecimento das batatas antes que sejam apanhadas do solo. As doenças são capazes, portanto, não só de diminuir a produção, mas também de provocar manchas, defeitos e apodrecimentos dos tubérculos, sendo assim a qualidade da cultura afectada desfavoravelmente.

Uma vez que a batateira é normalmente propagada vegetativamente, o "tubérculo-semente" assegura a sobrevivência de agentes patogénicos responsáveis por algumas doenças (Hide & Lapwood, 1992). É o caso particular do míldio da batateira, doença causada pelo fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, provavelmente a doença mais grave que ataca esta planta e que se encontra espalhada mundialmente (Hooker,

1986; Burton, 1989; Hide & Lapwood, 1992). Um dos episódios mais dramáticos causados por esta doença ocorreu em meados do século XIX, na Irlanda, devido a uma epidemia catastrófica de míldio e que resultou na fome e emigração em massa da população. A propagação da doença está dependente das condições atmosféricas para o desenvolvimento do fungo e as perdas na quantidade da produção dependem da altura e da rapidez da destruição das folhas, o que pode acontecer em qualquer fase do desenvolvimento das plantas, se as condições atmosféricas forem favoráveis (Hide & Lapwood, 1992).

O míldio pode tornar-se epidémico mas a oportuna aplicação de um fungicida reduz, ou impede, o progresso da doença. Durante muitos anos, o combate ao míldio foi feito através da tradicional calda bordaleza (1kg $CuSO_4.5H_2O$ + 1kg $Ca(OH)_2$ em 100 dm^3 de água) e outros compostos de cobre, fungicidas que, embora eficazes, podem ser fitotóxicos para as plantas (Burton, 1989; Hide & Lapwood, 1992). Estes produtos têm sido substituídos pelos fungicidas orgânicos do grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe, zinebe, manebe, etc.), por compostos organometálicos (hidróxido de fentina e acetato de fentina) e, mais recentemente, pelas fenilamidas que actuam sistemicamente (metalaxil e oxadixil) (Hide & Lapwood, 1992). Recentemente a gravidade desta doença tornou-se ainda maior, devido ao aparecimento de raças patogénicas de *P. infestans* resistentes às fenilamidas, o que tem conduzido à utilização de combinações mistas de um fungicida sistémico com um fungicida de contacto, nomeadamente misturas que contenham, quer metalaxil com mancozebe, quer oxadixil com mancozebe. Esta prática tem-se revelado mais eficaz do que a utilização individual de cada fungicida, quer para controlar a doença, quer para impedir o crescimento de sub-populações resistentes (Bashan *et al.*, 1991; Sharma, 1992; Fontem & Aighewi, 1993; Samoucha *et al.*, 1993; Dowley & O'Sullivan, 1994).

Paralelamente às doenças existem pragas de importância económica considerável, como é o caso do escaravelho da batateira, também conhecido por escaravelho americano (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (Fig. 3). A sua introdução na Europa ocorreu por volta de 1921, através de França (Bordéus) e no nosso País foi detectado depois da II Guerra Mundial (Burton, 1989); é presentemente em Portugal, tal como em outros países da

Europa, uma das pragas mais graves que ataca esta planta (Heller *et al.*, 1991), devido à enorme quantidade de prejuízos que acarreta, uma vez que a destruição da parte aérea das plantas pode ser total. O insecto alimenta-se vorazmente das folhas e por vezes dos caules, provocando danos irreparáveis na cultura, podendo perder-se a produção na totalidade, sendo por isso considerada a praga mais destrutiva da batateira (Heller *et al.*, 1991; Raman & Radcliffe, 1992; Ferro *et al.*, 1993; Perlak *et al.*, 1993).

O escaravelho da batateira, no estado adulto hiberna no solo durante o Inverno, a uma profundidade de cerca de 0,5 m e, depois de emergir na Primavera, ataca as plantas. O insecto é muito fecundo, chegando cada fêmea a pôr cerca de 300-500 ovos; após alguns dias de incubação, nascem as larvas que se alimentam das folhas da planta e, depois de completarem o seu desenvolvimento enterram-se no solo e aí transformam-se em pupas. Uma ou duas semanas mais tarde, surgem os novos adultos, iniciando-se assim um novo ciclo. O escaravelho pode ter duas ou três gerações por ano, o que depende das condições climáticas (Burton, 1989).



Fig. 3 - Escaravelho da batateira; postura e larva (à esquerda) e insecto adulto (à direita). Reproduzido de Bárcia (1986).

Refira-se, por curiosidade, que a rápida e intensa difusão do escaravelho da batateira, na segunda metade do século XIX, nos Estados Unidos da América, parece estar na origem do uso de insecticidas; a utilização de um veneno humano (arsénico na forma de Paris Green), para o controlo deste insecto, constitui o primeiro exemplo, com sucesso, do controlo de

uma praga através da aplicação de um insecticida (van Emden, 1989; Raman & Radcliffe, 1992). Adicionalmente, muitos progressos no equipamento de aplicação dos produtos (por exemplo, pulverizadores) surgiram também em resposta a esta praga, incluindo o tratamento das plantas com recurso à utilização de aeroplanos (Raman & Radcliffe, 1992).

A medida de controlo mais eficaz para combater este insecto, é a utilização de insecticidas; no entanto, esta prática deve ser convenientemente dirigida, uma vez que o escaravelho da batateira tem uma elevada capacidade para desenvolver resistência a estes produtos. Os compostos organofosforados e os piretróides, são referidos como os insecticidas mais eficazes para o controlo desta grave praga (Burton, 1989).

Valor nutricional do tubérculo

Segundo alguns autores (Horton & Sawyer, 1985; Burton, 1989) são frequentes conceitos erróneos sobre o valor nutricional dos tubérculos. De facto, os tubérculos não são uma fonte rica em energia mas contêm proteínas de elevada qualidade, quantidades substanciais de vitaminas e minerais. Embora o conteúdo em proteínas seja relativamente baixo (cerca de 2 g/100 g peso fresco), quando se compara a batata com outras fontes vegetais, como por exemplo com os cereais, a batata pode constituir um significativo contributo nutricional nas dietas, principalmente nos países com um consumo *per capita* elevado. A análise dos aminoácidos das proteínas, mostra que a batata tem baixas concentrações de metionina e cistina (Storey & Davies, 1992 e referências), mas como contém quantidades apreciáveis de lisina, tem um papel importante nas dietas como suplemento dos alimentos pobres em lisina, como é por exemplo, o caso do arroz (Horton & Sawyer, 1985; Storey & Davies, 1992).

As fracções de proteínas solúveis e insolúveis são duas componentes do azoto total do tubérculo. O restante conteúdo azotado está presente como azoto não proteico, que contém quer azoto orgânico, quer inorgânico (Storey & Davies, 1992). A fracção de azoto orgânico não proteico é constituída por aminoácidos livres e as amidas glutamina e asparagina, sendo a contribuição deste azoto para o valor nutricional da batata,

proporcionalmente menos importante, do que os aminoácidos essenciais fornecidos pelas proteínas (Desborough, 1985).

A batata para além de conter proteínas de elevada qualidade nutricional, é também uma boa fonte de vitamina C e de algumas vitaminas do grupo B, em particular tiamina, niacina e vitamina B_6. Segundo Storey & Davies (1992), tubérculos recém-colhidos podem conter quantidades de vitamina C que variam entre 15 e 25 mg por 100 g de peso fresco; por isso, quando a batata é ingerida regularmente, pode constituir um suplemento de valor em vitamina C, especialmente em regiões onde os citrinos são normalmente ingeridos menos frequentemente. De acordo com Burton (1989), em Inglaterra, assim como em muitos outros países do norte da Europa, a batata constitui a principal fonte de vitamina C nas dietas alimentares.

Em relação aos minerais, a batata fornece ferro em quantidades moderadas, é rica em fósforo, magnésio e potássio e, o seu baixo conteúdo em sódio, torna-a particularmente útil nas dietas isentas de sal (Horton & Sawyer, 1985).

O conteúdo em amido, que constitui cerca de 10-25% do peso fresco dos tubérculos (Cutter, 1992), é uma das principais características usadas para avaliar a sua qualidade nutricional; outros hidratos de carbono presentes incluem açucares solúveis e hidratos de carbono estruturais, como a celulose (Dizengremel, 1985; Burton, 1989).

∴

1.2. Interdependência entre metabolismo do azoto, fotossíntese e respiração

O azoto (N) apesar de ser um nutriente não mais essencial para o crescimento das plantas do que qualquer outro dos nutrientes essenciais é geralmente considerado o mais limitante, condicionando o crescimento e produtividade das culturas, razão que levou a que

diferentes grupos de investigação procurassem compreender os processos metabólicos envolvidos na utilização do azoto pelas plantas.

No solo o azoto está disponível para as plantas principalmente sob a forma de nitrato. De facto, embora muito azoto no solo esteja presente em matéria orgânica da qual se liberta sob a forma de amónio, este ião é rapidamente convertido a nitrato pelas bactérias do solo (particularmente espécies de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* - nitrificação) e, por outro lado, quando a fertilização do solo é do tipo amoniacal, o amónio derivado é também oxidado a nitrato. Apesar do NO_3^- ser de um modo geral a principal forma de azoto disponível, as plantas podem utilizar directamente o ião amónio e esta situação ocorre principalmente quando as plantas crescem em solos ácidos, em que a nitrificação é inibida ou em outras situações em que temporariamente o NH_4^+ constitui a forma de azoto dominante no solo, quando, por exemplo, se faz adição de fertilizantes amoniacais ou ureia. Nestas situações o sistema radicular deve ser capaz de evitar que o nível intracelular de NH_4^+ se torne tóxico e, para tal, deve ser capaz de disponibilizar mais foto-assimilados das folhas para o metabolismo radicular. Contrariamente ao NH_4^+, o ião NO_3^- é relativamente inócuo e por esta razão é considerada a forma mais segura de fornecer azoto inorgânico às plantas.

Em condições normais a absorção de azoto inorgânico pelas plantas é condicionada pela sua disponibilidade no solo e, deste modo, quando externamente existe em maior concentração, muito do azoto é absorvido pela planta e é armazenado no seu interior. Em muitas plantas anuais a maior quantidade de azoto que elas utilizam é absorvido durante a fase vegetativa, sendo o posterior crescimento reprodutor realizado à custa da re-utilização do azoto acumulado nos tecidos vegetativos (Millard & Catt, 1988). Estudos realizados em *S. tuberosum* por Millard & Marshall (1986) demonstraram que esta planta tem a capacidade de absorver azoto em quantidade superior às suas necessidades imediatas, acumulando-se parte desse azoto nos caules e folhas. Ulteriormente é re-distribuído durante o crescimento, sobretudo para os ramos laterais, permitindo que as folhas se mantenham fotossinteticamente activas durante mais tempo; quantidades apreciáveis do azoto acumulado são também re-distribuídas para os tubérculos em crescimento (Millard & McKerron, 1986; Davies *et al.*, 1987).

O NO_3^- absorvido pela raiz é reduzido nestes orgãos e/ou na parte foliar. Porém, quando a absorção do NO_3^- excede a redução, o NO_3^- acumula-se no vacúolo das células (Stienstra, 1986). Esta acumulação pode ocorrer mesmo que a actividade da enzima que cataliza a redução do NO_3^- seja elevada (Runge, 1983). Quando a concentração de NO_3^- exógeno diminui deixa de estar disponível e as plantas podem utilizar o NO_3^- armazenado nos vacúolos (Stienstra, 1986).

A absorção de NO_3^- é mediada por transportadores que permitem a entrada selectiva deste ião da solução do solo, sendo alguns induzidos pelo próprio ião NO_3^-. As permeases não foram ainda caracterizadas, havendo, porém, trabalhos que descrevem que proteínas membranares são induzidas pelo ião NO_3^- podendo ter função de permeases (Ward *et al.*, 1988), existindo dados que sugerem que a própria enzima nitrato redutase pode, em parte, constituir uma proteína membranar envolvida na absorção do ião NO_3^- (Ward *et al.*, 1988).

Actualmente, admite-se que existem três sistemas de transporte distintos envolvidos na absorção do NO_3^- (King *et al.*, 1993 e referências). Um dos mecanismos é constitutivo, de baixa afinidade para o ião NO_3^-, apenas activo quando as concentrações de nitrato no meio são elevadas (LATS, low-affinity nitrate transport systems) (Siddiqi *et al.*, 1990), tendo sido sugerido por Siddiqi *et al.* (1990) e Glass *et al.* (1990) que a absorção do NO_3^- por este sistema de transporte pode ocorrer através de canais específicos para o ião nitrato. Quando os níveis de NO_3^- no meio são baixos, parecem ser activos dois sistemas de transporte de elevada afinidade para o ião nitrato (HATS, high-affinity nitrate transport systems), admitindo-se que um desses mecanismos de transporte é constitutivo (Aslam *et al.*, 1992; Siddiqi *et al.*, 1990), enquanto que o outro é induzido pela presença do ião NO_3^-, sendo a absorção deste ião um processo activo (Glass *et al.*, 1990). Apesar de ainda não se conhecer se cada sistema é composto por uma única e diferente proteína de transporte, ou se é o resultado de um só transportador que altera as suas propriedades cinéticas, em resposta a alterações nas condições ambientais, estudos recentes apontam para a existência de vários tipos de transportadores (Tsay *et al.*, 1993).

Após a absorção, o NO_3^- vai ser reduzido nas células da raiz ou pode ser transferido para as folhas. Na literatura encontram-se referências a plantas em que a redução do NO_3^- ocorre principalmente a nível radicular, como seja em espécies de lenhosas (gimnospérmicas) e espécies da família Phaseolaceæ. Em outro grupo de plantas a redução realiza-se fundamentalmente na parte aérea, sendo incluídas neste grupo, sobretudo, angiospérmicas herbáceas (Gojon *et al.*, 1994). Nestas, se a redução do NO_3^- ocorre nas raízes, é a um nível bastante reduzido. Num grande número de espécies a redução do NO_3^- ocorre quer nas raízes, quer nas folhas; contudo, o nível da redução nas raízes ou nas folhas depende de vários factores, incluindo a quantidade de NO_3^- fornecido às raízes, o genótipo dentro das espécies e a idade das plantas (Oaks, 1992 e referências).

A conversão de NO_3^- a NH_4^+ implica a intervenção sequencial de duas enzimas; a nitrato redutase (NR), que converte o NO_3^- em NO_2^- e a nitrito redutase (NiR), que reduz o nitrito a NH_4^+ (Fig. 4). A nitrato redutase, envolvida na redução do nitrato é uma enzima solúvel e quanto à sua localização surgem dados controversos. A NR da maior parte das plantas superiores, algas e fungos é considerada citoplasmática (Beevers & Hageman, 1980; Fischer & Klein, 1988; Vaughn & Campbell, 1988), contudo outros atribuem-lhe localização cloroplastidial (Kamachi *et al.*, 1987).

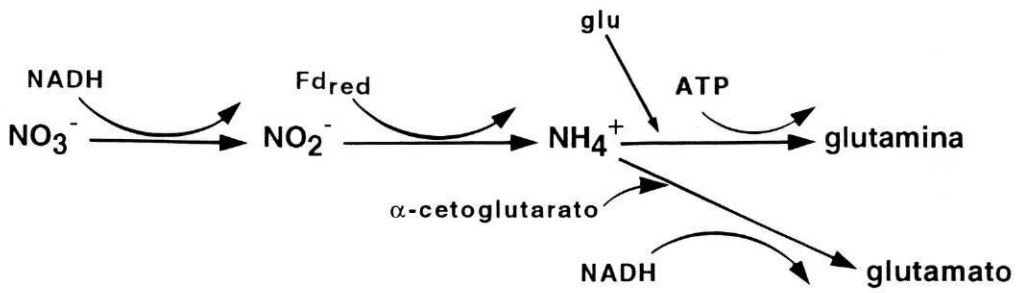


Fig. 4 - Reacções de redução do NO_3^- e de assimilação do NH_4^+. (Fd_{red} - ferredoxina reduzida; glu - glutamato). Adaptado de Sechley *et al.* (1992).

A enzima NR utiliza piridinonucleótidos reduzidos (NADH ou NADPH) (Evans & Nason, 1953), sendo uma das isoenzimas induzída pelo substracto. Nas plantas superiores e

numerosas algas eucarióticas encontram-se principalmente NRs dependentes especificamente do NADH, enquanto que nos fungos o NADPH parece ser o agente redutor preferido (Lewis, 1986; Kleinhofs & Warner, 1990). NRs bi-específicas ocorrem em algumas plantas superiores e espécies de algas. Na literatura é referida a ocorrência desta isoenzima nomeadamente em milho (Redinbaugh & Campbell, 1981; Long & Oaks, 1990), cevada (Dailey *et al.*, 1982; Harker *et al.*, 1986), soja (Orihuel-Iranzo & Campbell, 1980; Streit *et al.*, 1987) e arroz (Shen *et al.*, 1976). O nitrato constitui o sinal principal que induz a acumulação de NR não havendo acumulação de mRNA da NR na ausência do ião NO_3^- (Crawford *et al.*, 1992). A utilização de sondas de DNA mostrou que a indução pelo nitrato de mRNA é controlada a nível da transcrição, o que foi demonstrado em várias espécies (Kleinhofs & Warner, 1990 e referências). A resposta ao nitrato tem sido detectada em todas as plantas estudadas, porém, na literatura existem referências de NRs constitutivas. Nas folhas de soja foram isoladas e caracterizadas três isoenzimas distintas da NR. Uma delas é induzida pelo nitrato (NADH-NR ou iNR) e, é a isoforma mais comum nas plantas superiores, com um pH óptimo de 7,5; as outras duas isoenzimas são constitutivas, a NAD(P)H-NR (ou c_1NR) e a NADH-NR (ou c_2NR), ambas com actividade máxima a pH 6,5 (Streit *et al.*, 1987; Cathala *et al.*, 1992). Isoenzimas constitutivas foram também já encontradas em outras espécies, incluindo milho (Remmler & Campbell, 1986) e cevada (Melzer *et al.*, 1989).

Em adição ao nitrato outros factores influenciam o nível da NR, incluindo a luz, níveis de CO_2, ritmos circadianos, factores cloroplastidiais e citocininas (Crawford *et al.*, 1992). Na presença do nitrato, a luz estimula a acumulação de mRNA da NR. Melzer *et al.* (1989) verificaram que plantas verdes de cevada não respondiam à luz vermelha mesmo quando colocadas na obscuridade durante 12 h antes do tratamento com nitrato e com luz, mas que a luz branca estimulava a acumulação de mRNA da NR. Em contraste, em plântulas estioladas de cevada (Melzer *et al.*, 1989) e em cotilédones estiolados de *Curcubita maxima* L. (Rajasekhar *et al.*, 1988) a regulação da expressão dos genes da NR pela luz parece ser mediada pelo fitocromo.

Se a iluminação alternar num ciclo diurnal, então os níveis de mRNA da NR também variam ciclicamente como foi demonstrado em *Nicotiana tabacum* L., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh e *Zea mays* L. (Deng *et al.*, 1990; Bowsher *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1991). Estas flutuações rítmicas do mRNA parecem ser controladas por um relógio biológico (Deng *et al.*, 1990); Galangau *et al.* (1988) demonstraram que durante um ciclo luz/obscuridade, os níveis de mRNA da NR nas folhas atingiam o valor máximo e valor mínimo, no início e no fim do período de luz, respectivamente. Mais recentemente, verificou-se em folhas de espinafre, que a transição de luz para a obscuridade resultava numa rápida e eficiente inactivação da NR, provavelmente como resultado duma modificação reversível da enzima (Riens & Heldt, 1992).

Um outro sinal importante no controlo do nível da NR e de mRNA parece ser o CO_2 (Kaiser & Förster, 1989; Pace *et al.*, 1990; Quick *et al.*, 1991a). Kaiser & Brendle-Behnisch (1991) verificaram que quando plantas iluminadas eram colocadas numa atmosfera sem CO_2, a actividade da NR diminuía em minutos, voltando a aumentar quando a concentração de CO_2 era restabelecida aos níveis ambientais.

Adicionalmente, é necessário um sinal plastidial para a expressão dos genes da NR (Oelmüller *et al.*, 1988). Foi demonstrado que para este factor plastidial ser activo, necessita de luz e integridade dos plastídios, verificando-se que é inibida a acumulação de elevados níveis de mRNA da NR, após a destruição dos cloroplastos por foto-oxidação (Oelmüller & Briggs, 1990; Schuster & Mohr, 1990).

Relativamente ao efeito do NH_4^+ e aminoácidos na indução da actividade da NR, os resultados são variáveis e controversos; no entanto, tem sido sugerido que a glutamina pode exercer um controlo negativo na expressão dos genes da NR (Callaci & Smarrelli, 1991). Trabalhos realizados recentemente por Li *et al.* (1993) mostraram que quando era fornecido NH_4^+ juntamente com NO_3^- a plântulas de *Zea mays* ocorria uma ligeira diminuição da actividade da NR, da proteína NR e do mRNA da NR relativamente à resposta observada quando era usado apenas NO_3^-. Ao contrário, quando em vez de NH_4^+ era fornecida glutamina verificava-se um acentuado decréscimo nos níveis da actividade da NR, da proteína NR e do mRNA da NR, particularmente na raiz.

Adicionalmente, Sivasankar & Oaks (1994), utilizando também plântulas de milho, observaram que a glutamina ou asparagina na concentração de 1 mM provocava uma inibição da actividade da NR nos tecidos radiculares de cerca de 80%, enquanto que na parte aérea era necessário utilizar concentrações da ordem dos 10 mM para provocar uma inibição semelhante. Vincentz *et al.* (1993) demonstraram que o fornecimento de glutamina ou glutamato a folhas destacadas de plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* L. crescidas em condições de baixa intensidade luminosa provocava uma diminuição do nível de mRNA da NR. Neste estudo foram, porém, utilizadas concentrações bastante elevadas de aminoácidos (100 mM), relativamente às concentrações fisiológicas detectadas em folhas de tabaco e que variavam de 0,5 a 5 mM (Vincentz *et al.*, 1993). No mesmo trabalho, Vincentz *et al.* (1993), utilizando plantas adaptadas à obscuridade (65 h de obscuridade), baseados na análise dos níveis de mRNA demonstraram que, ao contrário do efeito dos aminoácidos, a adição de frutose, glucose ou sacarose às folhas resultava na indução da expressão génica da NR e sugerem que a regulação da expressão dos genes desta enzima pela luz é, pelo menos em parte, mediada pela síntese de hidratos de carbono sintetizados na fotossíntese.

É frequentemente interpretado que uma elevada actividade da NR num orgão é sinal duma significativa redução do nitrato nesse orgão (Beevers & Hageman, 1980; Andrews, 1986). Trabalhos realizados por Kapoor & Li (1982) em *Solanum tuberosum* mostraram que os níveis de actividade da NR nas folhas, orgão onde nesta planta a enzima se encontra quase exclusivamente localizada, estavam correlacionados positivamente com as concentrações foliares de azoto inorgânico, aminoácidos livres e proteínas durante o desenvolvimento das plantas; no mesmo estudo foi demonstrado que o conteúdo de azoto proteico dos tubérculos acompanhava o nível de actividade da NR nas folhas e, é sugerido, que a enzima NR pode constituir um indicador útil do momento em que deverá ser aplicado fertilizante azotado, com o objectivo de aumentar o conteúdo em proteínas dos tubérculos. Por outro lado, Chanda *et al.* (1987) referiram que diferentes factores limitam a actividade da NR determinada com a técnica *in vivo* em folhas de *Pennisetum americanum*

(L.) Leeke e, concluíram que, nesta planta, a actividade da NR pode não servir como marcador bioquímico da eficácia de utilização do azoto.

Para determinar a actividade da NR podem ser utilizados os métodos *in vitro* (Evans & Nason, 1953), *in vivo* (Jaworski, 1971) e *in situ* (Robin *et al.*, 1983). O método *in vitro* permite a quantificação da actividade máxima da NR em condições óptimas (pH, temperatura, concentração de substractos), e por isso os valores encontrados muitas vezes excedem a redução real do NO_3^- na planta (Brunetti & Hageman, 1976). Davies & Ross (1985) quantificaram a actividade da NR em folhas de *S. tuberosum* utilizando os métodos *in vitro* e *in vivo* e, verificaram que, a actividade enzimática era três a quatro vezes mais elevada quando era utilizado o método *in vitro*. Com o método *in vivo* é mantida a compartimentação celular e a actividade da enzima é também determinada pela condição fisiológica do tecido (Davies & Ross, 1985). Como consequência, encontra-se uma relação satisfatória entre a actividade da NR quantificada com este método e a acumulação de azoto orgânico na planta (Brunetti & Hageman, 1976; Naik *et al.*, 1982). Uma das desvantagens apontadas ao método *in vivo* refere-se à restrição das condições experimentais de obscuridade e anaerobiose, muito diferentes das condições fisiológicas normais das folhas e de outros tecidos vegetais (Soares *et al.*, 1985; Soussana *et al.*, 1989). Um outro método utilizado para a determinação da actividade da NR é o método *in situ*, no qual as determinações são também realizadas em condições de obscuridade e anaerobiose, mas diferindo do método *in vivo* porque os orgãos aéreos são incubados intactos em meio gasoso, mantendo-se assim a integridade das estruturas celulares da planta (Robin *et al.*, 1983).

O nitrito resultante da reacção mediada pela NR é reduzido a NH_4^+ com a intervenção da nitrito redutase. Esta enzima tem localização plastidial, quer nas folhas, quer nos tecidos radiculares (Dalling *et al.*, 1972a,b), e utiliza ferredoxina como agente redutor (Oaks & Hirel, 1985; Bowsher *et al.*, 1992). A NiR é regulada pelo nitrato e pela luz. A sua actividade aumenta em resposta ao nitrato ou nitrito e à luz (Ingle *et al.*, 1966; Beevers & Hageman, 1980; Gupta & Beevers, 1983; Kramer *et al.*, 1989; Back *et al.*, 1991; Faure *et al.*, 1991; Rastogi *et al.*, 1993). Demonstrou-se que o NO_2^- formado entra para o cloroplasto

(Anderson & Done, 1978), onde é reduzido a NH_4^+. A entrada ocorre a maior velocidade à luz do que na obscuridade (Brunswick & Cresswell, 1988). Inicialmente pensou-se que a redução do NO_2^- só poderia realizar-se à luz por ser necessário ter disponível ferredoxina reduzida, porém, demonstrou-se que o NADPH é capaz de reduzir a ferredoxina (Davis & San Pietro, 1977) e posteriormente Aslam & Huffaker (1984) verificaram que, se suficiente quantidade de hidratos de carbono fôr disponível, o NO_3^- ou NO_2^- pode ser reduzido na obscuridade. O NH_4^+, produto da reacção catalizada pela NiR vai ser incorporado num composto orgânico através do ciclo glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) (Miflin & Lea, 1977).

A primeira reacção deste ciclo, é mediada pela glutamina sintetase formando-se glutamina. Nas folhas encontram-se duas isoformas da glutamina sintetase, designadas GS_1 e GS_2. Estudos de fraccionamento celular demonstraram que a GS_1 está localizada no citoplasma, enquanto que a GS_2 está associada especificamente com os cloroplastos (Mann *et al.*, 1979; Hirel & Gadal, 1980). A localização da GS_2 em cloroplastos de plantas de espinafre foi confirmada por imunofluorescência indirecta (Hirel *et al.*, 1982) e, posteriormente, a utilização de técnicas de imunolocalização com ouro coloidal confirmou a presença da mesma isoenzima (GS_2) em cloroplastos de folhas de *Licopersicum esculentum* L. (Botella *et al.*, 1988a), de *Glycine max* L. (Brangeon *et al.*, 1989) e de *Phaseolus vulgaris* L. (Datta *et al.*, 1991). Recentemente, no nosso laboratório, em folhas de *S. tuberosum* e *N. tabacum* através de imunocitoquímica ultraestrutural, foi demonstrado que a GS_2 está localizada predominantemente nos cloroplastos de células do mesófilo e a GS_1 está especificamente localizada no citoplasma de células floémicas (Pereira *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1992).

A proporção de GS_1 e GS_2 nas folhas varia com as espécies (McNally *et al.*, 1983) e é influenciada por muitos factores, incluindo a fase de desenvolvimento foliar (Tobin *et al.*, 1985) e factores ambientais, nomeadamente a luz (Hirel *et al.*, 1982). Por exemplo, nas plantas estioladas, a isoforma citoplasmática é a que predomina (Guiz *et al.*, 1979; Mann *et al.*, 1979; 1980), passando a ser a GS_2 a isoenzima dominante, após transferência das plantas para a luz. Para além da indução da GS_2 pela luz, esta isoforma nas folhas, é também induzida pelo NH_4^+ (Edwards & Coruzzi, 1989). Por outro lado, a GS_1 não é

influenciada pela luz (Tingey *et al.*, 1987), mas pode ser induzida pelo NH_4^+ (Kozaki *et al.*, 1991).

Estudos moleculares com plantas transgénicas, em que foram usados genes quiméricos construídos por fusão de regiões promotoras de genes, ou da GS_1, ou da GS_2, com o gene marcador ß-glucuronidase (GUS), mostraram que o promotor da GS_2 dirigia a expressão do GUS predominantemente nas células com cloroplastos, enquanto que o da GS_1 dirigia a expressão do gene nas células de floema das folhas das plantas transgénicas (Forde *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1990). Estas observações dão suporte aos resultados de Wallsgrove *et al.* (1987), que sugerem que a localização da GS_2 está relacionada com a intervenção desta isoenzima na assimilação do NH_4^+ produzido na fotorrespiração.

Trabalhos realizados por Kamachi *et al.* (1991) em folhas senescentes de plantas de arroz, demonstraram que a GS_2 (proteína e actividade) desaparecia em simultâneo com outras proteínas cloroplastidiais (nomeadamente, ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase e Fd-glutamato sintase), enquanto que a isoforma GS_1 permanecia estável durante o período de senescência foliar. Estes resultados, associados à localização desta isoenzima nos feixes vasculares (Kamachi *et al.*, 1992), sugerem que a GS citoplasmática está envolvida na síntese de glutamina destinada a transporte (Edwards *et al.*, 1990; Sechley *et al.*, 1992; Oaks, 1994a). Actualmente, considera-se provável que o significado fisiológico das isoformas da GS (cloroplastidial e citoplasmática) não é sobreponível (Edwards *et al.*, 1990; Sechley *et al.*, 1992; Oaks, 1994a); porém, se tal acontece, então a sobrevivência daquelas plantas que nas folhas têm apenas uma só das isoenzimas (McNally *et al.*, 1983), necessita de ser esclarecida.

Nas raízes a GS está localizada predominantemente no citoplasma (Hirel & Gadal, 1980; Suzuki *et al.*, 1981); no entanto, encontra-se também actividade da GS plastidial nas raízes de algumas espécies, com é o caso de *Pisum sativum* L. cv. "Little Marvel" (Vézina *et al.*, 1987; Vézina & Langlois, 1989).

A síntese de glutamato pode ser mediada pela glutamato sintase (GOGAT) ou pela desidrogenase do glutamato (GDH). Nas plantas superiores existem duas isoformas da

GOGAT, uma que utiliza NADH ou NADPH como agente redutor e outra que utiliza ferredoxina (Sechley *et al.*, 1992). Esta última isoenzima (Fd-GOGAT) é a que predomina, quer nos tecidos verdes (Lea & Miflin, 1974; Suzuki & Gadal, 1982; Yamaya *et al.*, 1992), quer nos não verdes (Matoh *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1983; 1984; 1988; Sechley *et al.*, 1991). A isoenzima dependente de NAD(P)H é muito menos activa do que a Fd-GOGAT e, excepto nos nódulos radiculares dos legumes, tem sido pouco estudada (Sechley *et al.*, 1992). Nas folhas verdes, a Fd-GOGAT está localizada nos cloroplastos (Matoh & Takahashi, 1981; Botella *et al.*, 1988b), assim como a NADH-GOGAT (Matoh & Takahashi, 1981), embora, outros sugiram que a NADH-GOGAT tem localização citoplasmática (Hecht *et al.*, 1988). Tal como acontece com a GS plastidial, a actividade da Fd-GOGAT aumenta nas folhas durante o reverdecimento (Matoh & Takahashi, 1981; Suzuki *et al.*, 1982; Wallsgrove *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1987a), ocorrendo em simultâneo uma diminuição da actividade da NADH-GOGAT, como foi observado em plantas de milho (Suzuki *et al.*, 1987a). Nas folhas, o principal papel fisiológico da Fd-GOGAT parece ser a re-assimilação do NH_4^+ produzido na fotorrespiração (Keys *et al.*, 1978; Somerville & Ogren, 1980; Kendall *et al.*, 1986).

Nas raízes quer a Fd-GOGAT, quer a NAD(P)H-GOGAT, estão localizadas nos plastídios (Oaks & Hirel, 1985; Bowsher *et al.*, 1993). Recentemente, Redinbaugh & Campbell (1993) verificaram que os níveis de mRNA, quer da GS_2, quer da Fd-GOGAT, surgiam aumentados em raízes de milho em resposta ao NO_3^-, sendo essa resposta específica ao NO_3^- e, concluíram que, tal como a expressão génica da NR e da NiR, a expressão dos genes da GS_2 e da Fd-GOGAT é induzida directamente pelo NO_3^-.

Apesar de actualmente se considerar ser o ciclo da GS/GOGAT a principal via para a incorporação de NH_4^+ nas plantas superiores, subsistem dúvidas quanto ao papel da desidrogenase do glutamato (GDH). Recentemente tem-se considerado que a GDH está provavelmente envolvida na oxidação do glutamato (Miflin & Lea, 1976; Lea *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1991; 1992), contudo, outros consideram que não existem ainda resultados conclusivos quanto à função da GDH nas plantas superiores, sendo mesmo posto em

causa o envolvimento desta enzima na oxidação do glutamato (Sechley *et al.*, 1992; Oaks, 1994a e referências).

A síntese e o metabolismo do glutamato são de grande importância na assimilação do azoto inorgânico ocupando este composto orgânico posição primordial no metabolismo do azoto. De facto, o glutamato é utilizado para a síntese de diferentes moléculas orgânicas; é incorporado nas proteínas e é dador do grupo amino para muitos aminoácidos presentes nas proteínas. O glutamato é também o precursor para a síntese de arginina, prolina e clorofila (Lawlor, 1987; Bryan, 1990). A glutamina, produzida na primeira reacção do ciclo, pode ser usada de imediato como substrato da GOGAT ou em outras reacções de transamidação, ou pode ser usada na síntese de proteínas e como forma de exportar carbono e azoto para outras partes da planta (Sechley *et al.*, 1992).

Como já referido a redução do nitrato a NH_4^+ e a assimilação deste, exige energia metabólica (ATP), compostos que actuem como dadores de electrões ou de H^+ (ferredoxina, NADH, NADPH), e um composto (esqueleto carbónico α-cetoglutarato), havendo uma estreita ligação funcional entre o metabolismo do azoto e o do carbono.

Nas plantas superiores para a redução do NO_3^- pode ser usado o NADH ou o NADPH, pois como referido, para além da NADH-NR, podem possuir também NAD(P)H-NRs bi-específicas. O poder redutor (NADPH) e o ATP produzidos nos cloroplastos e necessários para que certas reacções citoplasmáticas possam ocorrer, só podem ser usados graças à existência de mecanismos que os transferem do cloroplasto para o citoplasma. Um desses mecanismos de "vaivém" troca dihidroxiacetona fosfato por o ácido fosfoglicérico, via translocador fosfato. No cloroplasto o ácido fosfoglicérico, com consumo de NADPH e ATP, é metabolizado a dihidroxiacetona fosfato que, no citoplasma, é de novo convertida em ácido fosfoglicérico com produção de NADH e ATP. O ácido fosfoglicérico é então enviado para o cloroplasto e o NADH no citoplasma pode ser usado para a redução do NO_3^- a NO_2^- (Lawlor, 1987; Sechley *et al.*, 1992). Entre o cloroplasto e o citoplasma existe um outro "vaivém" que troca malato por oxaloacetato. De novo no cloroplasto o NADPH é usado para produzir malato e, no citoplasma, vai produzir-se NADH pela oxidação do

malato a oxaloacetato (Sechley *et al.*, 1992). Foi proposta uma outra via de obtenção de NADH através do "vaivém" malato/oxaloacetato entre a mitocôndria e o citoplasma (Woo & Canvin, 1980). Porém, a contribuição relativa deste "vaivém" durante o período de luz, tem sido posta em causa (Dry *et al.*, 1987).

Nas raízes, a NR pode usar os piridinonucleótidos NADH ou NADPH como agentes redutores (Warner *et al.*, 1987; Long & Oaks, 1990). Ambos podem ser fornecidos pela desidrogenase da glucose-6-fosfato ou pela desidrogenase do 6-fosfogluconato, que estão presentes no citoplasma (Emes & Fowler, 1979; Oji *et al.*, 1985), ou pelo "vaivém" malato/oxaloacetato entre a mitocôndria e o citoplasma, em que o malato que é produzido na mitocôndria é oxidado a oxaloacetato no citoplasma (Naik & Nicholas, 1986).

No caso de enzimas especificamente dependentes da ferredoxina reduzida presentes em tecidos não fotossintéticos, pensa-se que é a via das pentose fosfato que fornece o poder redutor via NADPH-ferredoxina redutase, não só para a NiR como para a Fd-GOGAT (Sechley *et al.*, 1992).

A absorção do nitrato não é portanto independente da actividade fotossintética, mesmo quando a redução e assimilação do azoto inorgânico se realiza nas raízes. Porém, a fotossíntese não é importante apenas para a assimilação do azoto inorgânico, mas é essencial para a síntese de hidratos de carbono indispensáveis para o crescimento vegetal, sendo a produtividade das plantas em grande parte determinada pela actividade fotossintética. De acordo com Brändén *et al.* (1991), a fotossíntese é responsável pela fixação anual de 10^{11} toneladas de CO_2 na biosfera e do qual depende toda a agricultura.

As reacções da fotossíntese que envolvem a fixação do CO_2 e a produção de hidratos de carbono constituem uma via metabólica conhecida como ciclo fotossintético de redução do carbono, também chamado ciclo de Calvin-Benson, em homenagem a dois cientistas que contribuíram de modo fundamental para o conhecimento da sequência de reacções neste ciclo, no qual existem três etapas principais:

1ª) a assimilação do dióxido de carbono através da carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato

2ª) a redução do carbono fixado até hidratos de carbono

3ª) a regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato

Na 1ª fase do ciclo, três moléculas de dióxido de carbono são condensadas com três moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato através da actividade da enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo), formando-se seis moléculas de 3-fosfoglicerato. Estas seis moléculas são então fosforiladas por seis moléculas de ATP e originam seis moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato, que são convertidas em seis moléculas de gliceraldeído 3-fosfato através duma reacção de desfosforilação com consumo de NADPH. O gliceraldeído 3-fosfato está em equilíbrio com o seu isómero dihidroxiacetona fosfato através da actividade da enzima triose-fosfato isomerase; estes dois compostos, com três átomos de carbono, são interconvertíveis e são conhecidos como trioses fosfato. A redução das seis moléculas de 3-fosfoglicerato a seis moléculas de gliceraldeído 3-fosfato e a sua interconversão com dihidroxiacetona fosfato constitui a fase redutora do ciclo fotossintético de redução do carbono. Uma molécula de triose fosfato formada pode ser retirada do ciclo e ser utilizada para a produção de hidratos de carbono, enquanto que as cinco moléculas restantes de trioses fosfato são usadas para regenerar as três moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato utilizadas na reacção inicial de carboxilação. A fase de regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato consiste numa sequência complexa de interconversões de compostos contendo três a sete átomos de carbono, que termina com a formação de três moléculas de ribulose 5-fosfato; estas são subsequentemente fosforiladas com três moléculas de ATP, originando-se três moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato. Como o primeiro produto da fixação do CO_2 é um intermediário com três átomos de carbono (C_3), o ciclo fotossintético de redução do carbono é muitas vezes referido como via C_3 ou fotossíntese C_3.

Nas plantas com fotossíntese C_3 , como é o caso da batateira, a RuBisCo é uma enzima bi-funcional, que cataliza não só a carboxilação, mas também a oxigenação da ribulose 1,5-bisfosfato (Fig. 5). A oxigenação da ribulose 1,5-bisfosfato, que ocorre no mesmo local activo que a carboxilação, produz fosfoglicerato e um composto com dois átomos de carbono, o fosfoglicolato. Embora a afinidade da RuBisCo para o dióxido de carbono seja maior do que para o oxigénio, o facto é que a concentração atmosférica deste é muito maior do que a concentração de dióxido de carbono, contribuindo ambas as reacções, a de

carboxilação e a de oxigenação, para o consumo da ribulose 1,5-bisfosfato. Uma vez que ambos os substractos, o oxigénio e o dióxido de carbono, reagem com o mesmo local activo da RuBisCo, a interacção entre os dois é competitiva, verificando-se que em condições normais a razão carboxilação/oxigenação é de 3:1 a 4:1 (Rawn, 1989).

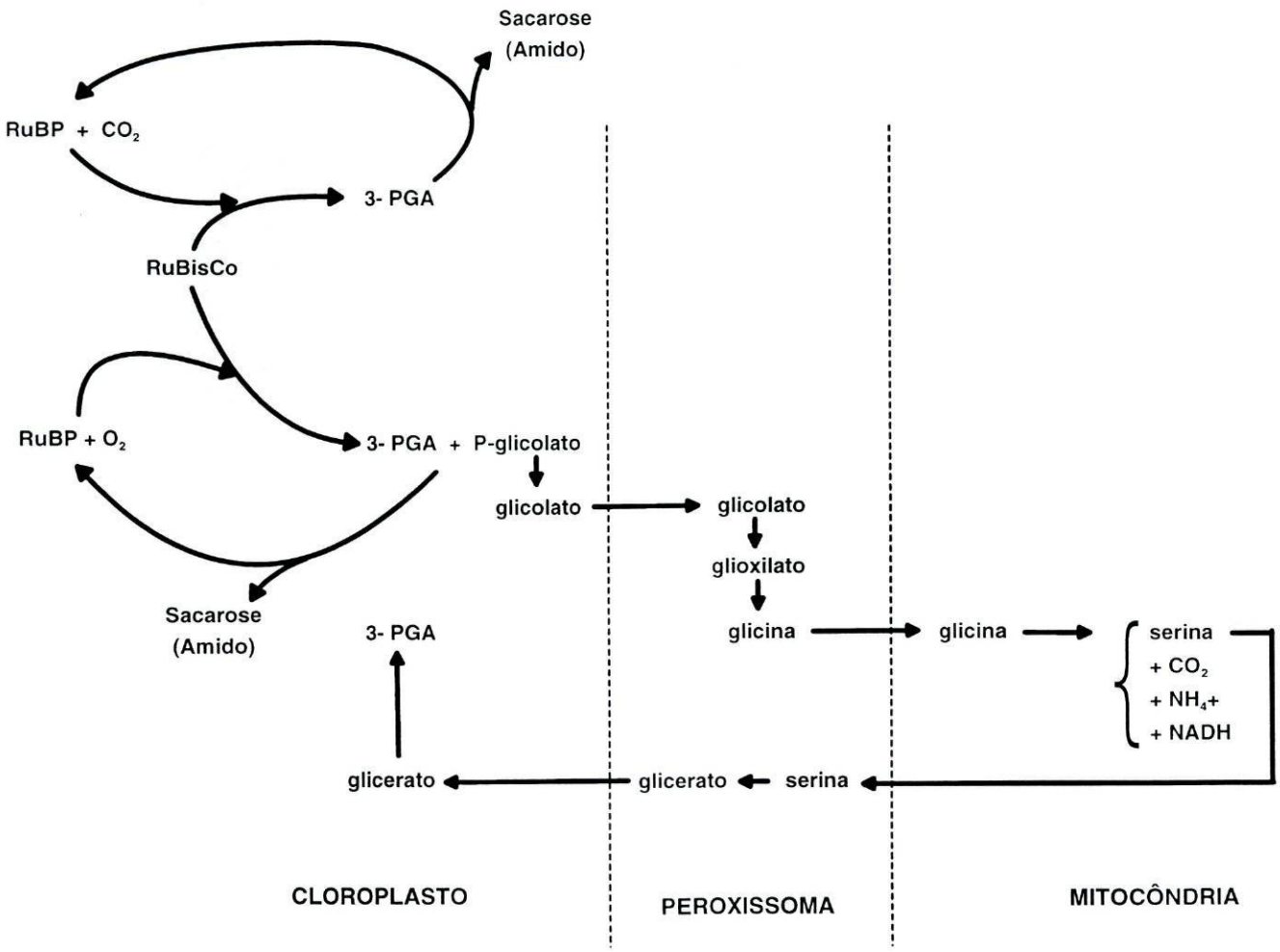


Fig. 5 - Esquema representativo da fotorrespiração. A oxigenação da RuBisCo produz fosfoglicerato e fosfoglicolato, que depois de metabolizado dá origem a uma molécula de 3-fosfoglicerato. (RuBP - ribulose 1,5-bisfosfato; 3-PGA - 3-fosfoglicerato). Adaptado de Oaks (1994b).

Com a oxigenação da ribulose 1,5-bisfosfato forma-se fosfoglicolato, o primeiro produto duma via metabólica conhecida como fotorrespiração (Fig. 5). Nesta via metabólica, também conhecida como ciclo C_2, duas moléculas de fosfoglicolato, através duma série de reacções que ocorrem em três compartimentos celulares distintos (cloroplasto, peroxissoma e mitocôndria), são metabolizadas para formar uma molécula de 3-fosfoglicerato, o qual pode ser incorporado no ciclo fotossintético de redução do carbono.

A actividade de oxigenase da RuBisCo limita a eficiência fotossintética e consequentemente a produtividade das plantas, podendo em determinadas condições atmosféricas, a via fotorrespiratória reduzir até 50% a eficiência da fotossíntese (Brändén *et al.*, 1991). Porém, em condições de elevada intensidade luminosa e baixas concentrações de CO_2, a fotorrespiração constitui um mecanismo de dissipar energia fotoquímica, porque nesta via metabólica gasta-se quer energia, quer poder redutor; o metabolismo do fosfoglicolato pode, portanto, proteger os pigmentos fotossintéticos de danos de natureza fotoquímica, porque impede a acumulação de ATP e de NADPH quando estes não são rapidamente consumidos pela assimilação do carbono (Rawn, 1989).

Como foi anteriormente referido, é através da actividade do ciclo fotossintético de redução do carbono que se formam trioses fosfato que podem ser subsequentemente usadas na síntese de sacarose e amido. A sacarose é sintetizada exclusivamente no citoplasma, sendo subsequentemente translocada para regiões da planta que não têm capacidade fotossintética, enquanto que o amido se forma no estroma do cloroplasto e constitui uma reserva temporária de carbono, acumulando-se durante o dia dentro do cloroplasto, podendo ser degradado durante a noite (Emes & Tobin, 1993). Esta compartimentação celular torna necessário o transporte de metabolitos através do invólucro cloroplastidial. O transportador de fosfato, já referido, localizado na membrana interna do cloroplasto facilita a exportação de produtos fotossintéticos deste organelo, trocando trioses fosfato com fosfato inorgânico do citoplasma, onde vai ser sintetizada a sacarose (Heldt *et al.*, 1991). Quando a via biossintética da sacarose não está activa, não se forma fosfato inorgânico no citoplasma e, nestas condições, as trioses fosfato são retidas no cloroplasto e podem ser

usadas para a síntese de amido; o ritmo de formação de sacarose no citoplasma pode portanto, indirectamente, controlar a síntese de amido no cloroplasto (Fig. 6).

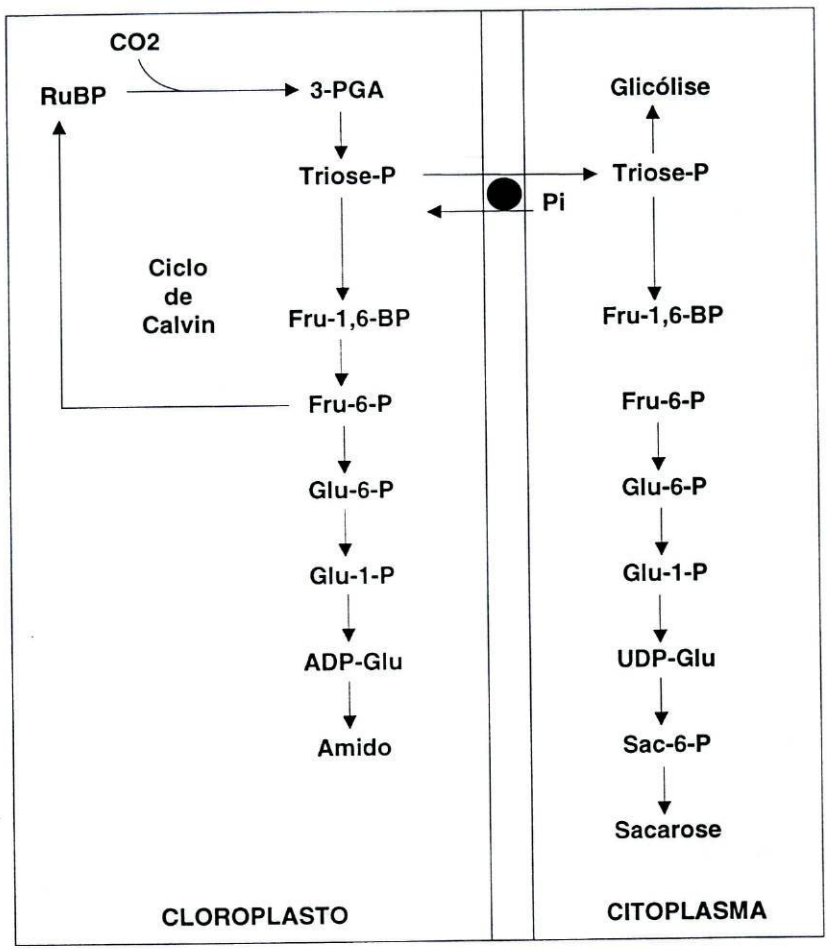


Fig. 6 - Síntese de amido e de sacarose, no cloroplasto e no citoplasma, respectivamente. (RuBP - ribulose 1,5-bisfosfato; 3-PGA - 3-fosfoglicerato; Fru-1,6-BP - frutose 1,6-bisfosfato; Fru-6-P - frutose 6-fosfato; Glu-6-P - glucose 6-fosfato; Glu-1-P - glucose 1-fosfato; ADP-Glu - ADP-glucose; UDP-Glu - UDP-glucose; Sac-6-P - sacarose 6-fosfato; Pi - fosfato inorgânico). Adaptado de Sonnewald & Willmitzer (1992).

No citoplasma, a produção de sacarose inicia-se, como referido, a partir das trioses fosfato exportadas do cloroplasto, que são convertidas em hexoses fosfato e por fim em sacarose. Existem pelo menos dois aspectos chave na regulação desta via biossintética. O primeiro

refere-se ao controlo da enzima frutose 1,6-bisfosfatase, pela frutose 2,6-bisfosfato, que funciona como metabolito regulador no metabolismo dos hidratos de carbono, particularmente na síntese da sacarose e o segundo ao controlo da actividade da enzima sacarose fosfato sintase.

No que diz respeito à complexa regulação da frutose 1,6-bisfosfatase pela frutose 2,6-bisfosfato, é importante conhecer como este composto é sintetizado e quais os factores que afectam a sua síntese. A frutose 2,6-bisfosfato é sintetizada a partir de frutose 6-fosfato, através da actividade de uma cínase específica (frutose 6-fosfato-2-cínase) localizada no citoplasma. Uma fosfatase (frutose 2,6-bisfosfatase) remove o fosfato e regenera a frutose 6-fosfato (Fig. 7).

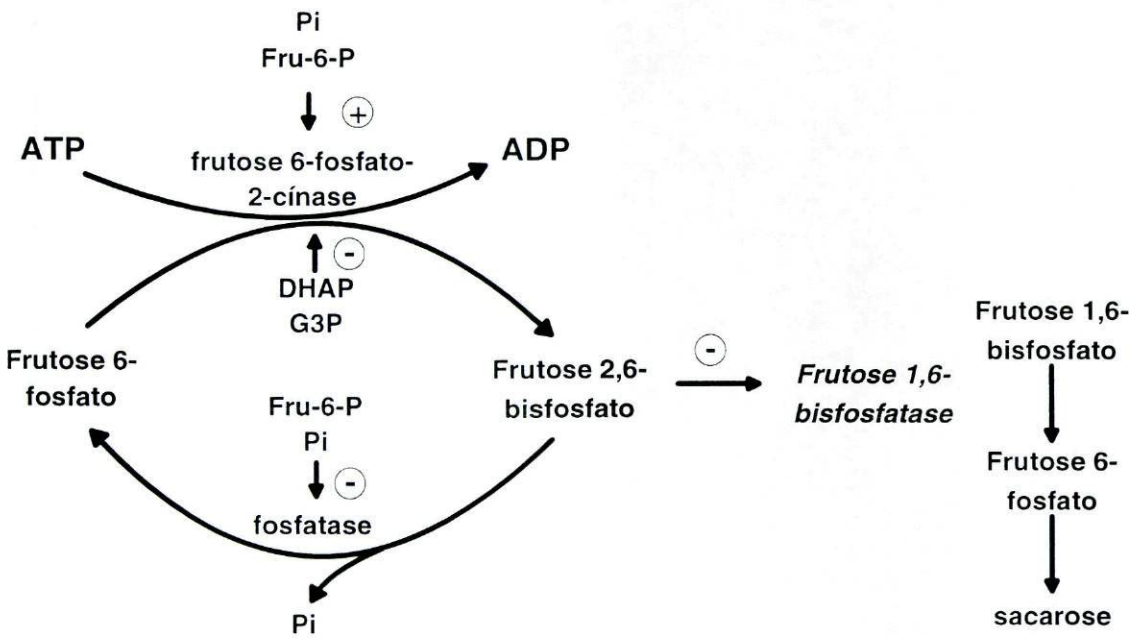


Fig. 7 - Regulação da frutose 1,6-bisfosfatase pela frutose-2,6-bisfosfato e o seu efeito na síntese de sacarose. (DHAP - dihidroxiacetona fosfato; Fru-6-P - frutose 6-fosfato; G3P - gliceraldeído 3-fosfato; Pi - fosfato inorgânico). Adaptado de Smith (1993).

As actividades destas duas enzimas (cínase e fosfatase), que vão determinar a concentração de frutose 2,6-bisfosfato *in vivo* são reguladas por determinadas moléculas, que são também metabolitos chave na síntese da sacarose (Stitt, 1990). A frutose 6-fosfato e o fosfato inorgânico são activadores da cínase, mas inibidores da fosfatase e, portanto, vão conduzir a uma maior concentração da frutose 2,6-bisfosfato no citoplasma. Este aumento conduz à inibição da frutose 1,6-bisfosfatase e consequentemente à diminuição da síntese de sacarose. Por outro lado, os compostos dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, são inibidores da cínase e não têm qualquer efeito na fosfatase. Deste modo, aumentos na concentração destes intermediários com três átomos de carbono conduzem a um decréscimo no nível da frutose 2,6-bisfosfato e, portanto, a frutose 1,6-bisfosfatase não é inibida. O significado das alterações da concentração da frutose 2,6-bisfosfato reside fundamentalmente no seu efeito inibidor da actividade da frutose 1,6-bisfosfatase (Fig. 7), a enzima que remove o fosfato inorgânico da frutose 1,6-bisfosfato, na via de síntese da sacarose (Stitt, 1990).

Um outro elemento chave na regulação da síntese de sacarose é a enzima sacarose fosfato sintase. A actividade desta enzima alostérica é controlada a dois níveis: um controlo alostérico pela glucose 6-fosfato (activador) e pelo fosfato inorgânico (inibidor) e um mecanismo que envolve a fosforilação da proteína (modificação covalente) (Huber & Huber, 1992; Huppe & Turpin, 1994). Na obscuridade a proteína é fosforilada e inactivada e, à luz, verifica-se que ocorre a sua desfosforilação e activação. A proteína activa apresenta uma maior afinidade para a glucose 6-fosfato e é menos sensível ao efeito inibidor do fosfato inorgânico. Desta forma, a modificação covalente afecta principalmente o local alostérico, onde a glucose 6-fosfato e o fosfato inorgânico são reguladores antagónicos (Huber & Huber, 1992). Embora a sacarose fosfato sintase não seja a única enzima a determinar a velocidade da síntese da sacarose, trabalhos realizados por Worrell *et al.* (1991) com plantas transgénicas exprimindo elevados níveis de sacarose fosfato sintase, demonstraram que esta enzima está envolvida na regulação da repartição de carbono entre amido e sacarose.

Como anteriormente referido, quando a via de síntese da sacarose não está activa, as trioses fosfato permanecem no cloroplasto e são metabolizadas via ciclo fotossintético de redução do carbono, através da actividade das enzimas aldolase e frutose 1,6-bisfosfatase, formando-se frutose 6-fosfato, que pode continuar no ciclo para a regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato ou pode ser desviada do ciclo para a formação de amido. A enzima chave que regula a síntese de amido no cloroplasto é a ADP-glucose pirofosforilase, que cataliza a formação de ADP-glucose a partir de ATP e glucose 1-fosfato e a resposta desta enzima ao 3-fosfoglicerato e ao fosfato inorgânico, parece constituir o elemento principal no processo regulador (Sowokinos & Preiss, 1982). A actividade da ADP-glucose pirofosforilase é afectada directamente pela razão 3-fosfoglicerato/fosfato inorgânico (3-PGA/Pi). Durante a fotossíntese, forma-se 3-fosfoglicerato pela carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato, enquanto que o fosfato inorgânico é gasto na fotofosforilação; uma elevada razão 3-PGA/Pi, o que traduz uma significativa actividade fotossintética, activa a ADP-glucose pirofosforilase, enquanto que uma baixa razão inibe a actividade da enzima. Assim, no estroma do cloroplasto a razão 3-PGA/Pi reflecte, quer a disponibilidade de carbono para a síntese de amido dentro do cloroplasto, quer a condição do metabolismo dos hidratos de carbono no citoplasma, permitindo que a síntese de amido seja coordenada com a actividade fotossintética e com o metabolismo da sacarose no citoplasma (Smith, 1993).

Quando a fotossíntese não está a ocorrer, o amido é mobilizado sendo os produtos resultantes da sua degradação utilizados pela planta, quer na respiração, quer no crescimento (Rawn, 1989). Assim, durante o processo respiratório ocorre consumo de hidratos de carbono e de outros compostos para produção de energia e substratos (por exemplo, ácidos orgânicos), necessários aos processos de síntese que ocorrem a nível celular (Lawlor, 1987).

Como foi referido a RuBisCo, desempenha um papel crucial, quer na fotossíntese, quer na fotorrespiração, constituindo cerca de 50% das proteínas solúveis das folhas (Emes & Tobin, 1993; Hartman & Harpel, 1994), sendo considerada a proteína mais abundante na

Natureza (Rawn, 1989) e uma importante reserva de azoto (Millard, 1988). Durante a ontogenia da folha, ocorrem alterações na síntese e degradação da RuBisCo, que podem ser divididas em três fases correspondentes à idade das folhas (Makino *et al.*, 1985). A primeira fase corresponde a um período de intensa síntese em que a quantidade da enzima aumenta com o desenvolvimento da folha, coincidindo a sua concentração máxima com a fase de expansão foliar completa (Makino *et al.*, 1985; Dann & Pell, 1989; Enyedi *et al.*, 1992). A fase seguinte corresponde a um período de um certo equilíbrio, entre a síntese e degradação da RuBisCo e, finalmente, quando a folha entra em senescência a concentração da enzima diminui de um modo regular (Dann & Pell, 1989). A degradação da RuBisCo em folhas senescentes ocorre em simultâneo com uma diminuição das clorofilas (Camp *et al.*, 1982; Secor *et al.*, 1984) e decréscimo na fixação fotossintética do dióxido de carbono (Friedrich & Huffaker, 1980; Camp *et al.*, 1982; Secor *et al.*, 1984); no entanto, resultados obtidos por Makino *et al.* (1983) em plantas de arroz, mostraram que durante a senescência foliar a actividade da RuBisCo decrescia mais rapidamente do que o conteúdo em clorofilas e, concluíram, que a diminuição de clorofilas nem sempre está relacionada com o decréscimo da fotossíntese. A diminuição da actividade ou níveis da RuBisCo durante a senescência foliar e, a correlação directa que existe entre a fotossíntese e a actividade da enzima, tem sido referida por vários autores (Makino *et al.*, 1983; Evans, 1983; Makino *et al.*, 1985; Suzuki *et al.*, 1987b; Dann & Pell, 1989; Jiang *et al.*, 1993). Devido à importância da RuBisCo na fixação fotossintética do carbono, é essencial que a sua quantidade e actividade sejam suficientes para que a fotossíntese possa ocorrer. Estudos moleculares utilizando a tecnologia do RNA de sentido contrário (antisense), com o objectivo de alterar o nível da RuBisCo em plantas de tabaco, mostraram que a actividade da enzima nas folhas das plantas transgénicas era apenas de 18% relativamente ao nível médio da actividade das plantas controlo, surgindo um decréscimo na fotossíntese de 63% (Hudson *et al.*, 1992). No entanto, trabalhos anteriores nos quais foram também utilizadas plantas transgénicas de tabaco, foram em certa medida mais esclarecedores, tendo sido demonstrado que uma redução de 43% no conteúdo da RuBisCo provocava efeitos insignificantes na actividade fotossintética; no entanto, qualquer redução adicional na

quantidade da enzima conduzia a uma acentuada inibição da fotossíntese (Quick *et al.*, 1991b). Face aos resultados encontrados, Quick *et al.* (1991b) concluíram que, nas condições ambientais usadas (340 μmol quanta m^{-2} s^{-1} e CO_2 ambiental), a RuBisCo estava presente em excesso cerca de 40%, relativamente às necessidades reais para manter a fotossíntese.

Sendo o decréscimo da actividade fotossintética um dos principais sintomas da senescência foliar (Ford & Shibles, 1988; Hashimoto *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1993) e, dado que a fotossíntese ocorre nos cloroplastos, as alterações da actividade, composição e estrutura destes organelos durante esta fase da ontogenia da folha, têm sido objecto de intenso estudo. Tem sido sugerido que os cloroplastos intactos podem ser transferidos para o vacúolo a aí são degradados, ocorrendo consequentemente um decréscimo na quantidade destes plastídios (Camp *et al.*, 1982; Wittenbach *et al.*, 1982); no entanto, outros consideram que a senescência foliar ocorre em duas fases, a primeira em que há uma diminuição do conteúdo em proteínas e clorofilas por cloroplasto, mas mantendo-se constante o número destes organelos por célula e uma fase terminal, durante a qual o número de cloroplastos por célula pode diminuir (Mae *et al.*, 1984; Wardley *et al.*, 1984; Ford & Shibles, 1988). Adicionalmente, foi demonstrado que as clorofilas (Matile *et al.*, 1992) e as proteínas do estroma (Mitsuhashi & Feller, 1992) podem ser degradadas em cloroplastos isolados com o invólucro plastidial intacto, admitindo-se, actualmente, que pelos menos as fases iniciais do catabolismo dos constituintes do cloroplasto ocorrem dentro do organelo intacto (Feller & Fischer, 1994).

Estudos a nível ultraestrutural mostraram que a senescência provoca modificações estruturais nos cloroplastos, ocorrendo um aumento no tamanho e número de plastoglóbulos e desorganização dos tilacóides granares e lamelas estromáticas (Hurkman, 1979; Ford & Shibles, 1988; Hashimoto *et al.*, 1989), verificando-se que só ulteriormente se dá a ruptura do invólucro do cloroplasto e decréscimo no número destes organelos (Ford & Shibles, 1988).

∴

1.3. Interacção "fonte"-"recebedor"

O crescimento e produtividade das plantas é dependente da actividade fotossintética e da translocação dos foto-assimilados do seu local de síntese para as regiões de utilização e/ou reserva. No caso particular da batateira, cerca de 95% da matéria seca do tubérculo provém do dióxido de carbono fixado fotossinteticamente, sendo os foto-assimilados também utilizados pela planta para fornecer energia e material estrutural para o crescimento foliar (Burton, 1989). Um acentuado crescimento dos tubérculos obtem-se apenas se as folhas estão suficientemente desenvolvidas; no entanto, se depois do início da formação dos tubérculos forem criadas condições ambientais favoráveis para que as folhas continuem a crescer acentuadamente, pode ocorrer redução na repartição dos hidratos de carbono para os tubérculos, o que afecta consequentemente o rendimento da cultura (Burton, 1989; Wolf, 1993). A actividade fotossintética, assim como a repartição dos foto-assimilados entre os vários orgãos da planta, podem ser afectadas, quer pela fase do desenvolvimento da planta, quer por factores ambientais, principalmente pela temperatura e pelo fotoperíodo (Gawronska *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 1990a,b). Wolf *et al.* (1990a) verificaram que temperaturas elevadas provocam uma redução acentuada na translocação de ^{14}C para os tubérculos e, ao contrário, ocorre um aumento significativo na translocação para os orgãos vegetativos (folhas e caules). No mesmo estudo foi demonstrado que o tubérculo é extremamente sensível ao regime de temperatura e fotoperíodo, ocorrendo uma inibição completa da sua formação na cv. Désirée, quando as plantas eram submetidas a um fotoperíodo de 16 horas, com temperaturas diurnas e nocturnas de 32°C e 22°C, respectivamente.

Sabe-se que a capacidade fotossintética das folhas se altera durante o desenvolvimento e, consequentemente, o metabolismo dos hidratos de carbono também se modifica. As folhas jovens são heterotróficas, isto é, dependem em parte dos hidratos de carbono importados de outras regiões da planta, enquanto que as folhas completamente

desenvolvidas são autotróficas e constituem a principal fonte de açucares e iões inorgânicos que são transportados (Fellows & Geiger, 1974; Turgeon, 1989). Resultados obtidos por Wolf (1993) indicam que no caso da batateira, as folhas tornam-se autotróficas numa fase inicial do desenvolvimento, conclusão que é baseada nos baixos níveis de hidratos de carbono importados pelas folhas localizadas acima da primeira folha completamente expandida (folha nº 5 ou 6). Em condições favoráveis, cerca de 90% dos foto-assimilados produzidos numa folha completamente desenvolvida podem ser translocados para os tubérculos em 24 horas (Moorby, 1978; Wolf *et al.*, 1990a). Embora se admita que são estas folhas completamente desenvolvidas a principal fonte de assimilados para o crescimento dos tubérculos, Wolf (1993) concluiu que as folhas mais velhas contribuem também, significativamente, para a produtividade, dado que estas são capazes de translocar grande parte dos seus foto-assimilados para os orgãos de reserva. A interacção entre a "fonte" de assimilados (folhas) e os orgãos para onde são translocados, quer para utilização, quer para reserva (orgãos "recebedores"), assim como o número de orgãos "recebedores", vai condicionar a quantidade de foto-assimilados que são translocados.

Recentemente, estudos moleculares realizados por Müller-Röber *et al.* (1992), nos quais foram utilizadas plantas transgénicas de batateira, em que a expressão da ADP-glucose pirofosforilase foi inibida utilizando a técnica do RNA de sentido contrário (antisense), mostraram que a redução da actividade desta enzima, resultava numa redução acentuada na formação de amido nos tubérculos. Adicionalmente, os resultados mostraram que nas plantas transgénicas aumentava acentuadamente o número de tubérculos formados por planta e diminuía o tamanho dos tubérculos, o que segundo Müller-Röber *et al.* (1992) pode ser interpretado como uma redução da capacidade do orgão "recebedor". Esta interpretação baseia-se na observação de que nas plantas controlo, os primeiros tubérculos a formarem-se, tornam-se no "recebedor" dominante, impedindo o desenvolvimento dos tubérculos que se originam mais tarde (Müller-Röber *et al.*, 1992; Sonnewald & Willmitzer, 1992). A observação de que nas plantas transgénicas se desenvolviam mais tubérculos e de menores dimensões, indica um menor poder de

competitividade relativamente à capacidade de orgão "recebedor", permitindo o desenvolvimento dos tubérculos, mesmo daqueles que se formaram mais tardiamente. Assim sendo, pode ser admitido que a inibição da actividade da ADP-glucose pirofosforilase e portanto a redução da síntese de amido, iria eliminar a formação do "recebedor" dominante, tornando esta enzima um possível factor condicionante da capacidade dos tubérculos atraírem as substâncias provenientes de outros locais da planta (capacidade de "recebedor"; "sink strenght") (Müller-Röber *et al.*, 1992; Sonnewald & Willmitzer, 1992), interpretação que vem dar suporte à hipótese sugerida por Preiss (1988), de que a velocidade de acumulação do amido regula a capacidade de importação de foto-assimilados.

∴

1.4. Tuberização

Formação e crescimento dos tubérculos

A tuberização na batateira é um processo complexo que resulta na diferenciação da extremidade de um caule subterrâneo (rizoma), num orgão de armazenamento, o tubérculo; um tubérculo é, portanto, um caule modificado com nós ("olhos") e entre-nós (Ewing, 1987). O primeiro sinal da formação do tubérculo é a dilatação da região sub-apical da extremidade do rizoma. Inicialmente apenas está envolvido um entre-nó e, após a sua expansão, entre-nós localizados acropetamente começam a ser incorporados no tubérculo em formação (Fig. 8). Há uma certa controvérsia na literatura se a expansão radial deste entre-nó é devida à divisão celular ou ao aumento do volume celular. Alguns autores consideram que a actividade mitótica na região da medula é responsável pelo desenvolvimento inicial do tubérculo (Artschwager, 1918; 1924; Reeve *et al.*, 1969); no entanto, outros atribuem a expansão radial inicial ao aumento do tamanho das células na região da medula, seguido rapidamente por divisão celular (Booth, 1963; Cutter, 1992). A tuberização continua

acropetamente envolvendo alguma extenção longitudinal e uma acentuada expansão no plano radial de entre-nós sucessivos (Fig. 8). Para além da actividade mitótica e aumento do volume celular, uma outra alteração durante a tuberização é a deposição de amido na extremidade do rizoma. Estudos bioquímicos mostraram que a síntese de amido ocorre antes de qualquer sinal vísivel da formação do tubérculo (Smith & Palmer, 1970).

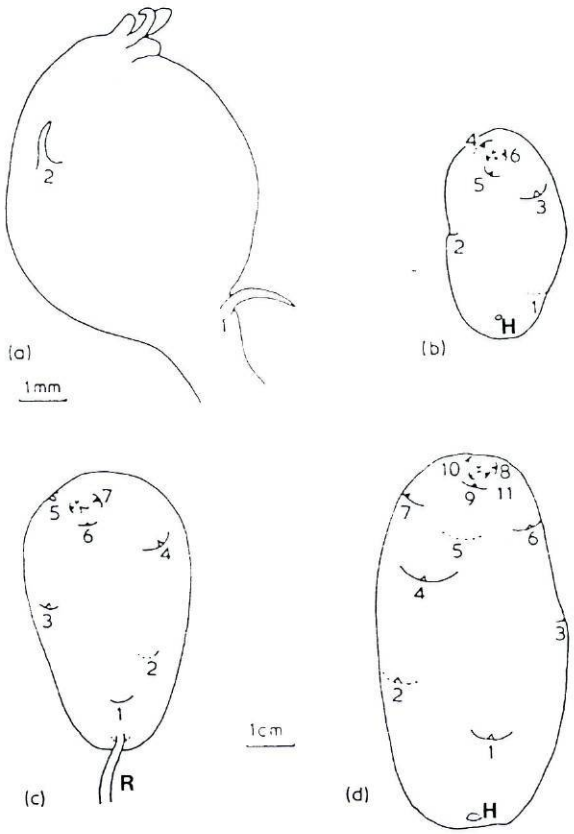


Fig. 8 - Tubérculos em desenvolvimento cv. Arran Pilot. (a) tubérculo jovem com o segundo entre-nó a ser incorporado (5x); (b-d) tubérculos com 6, 8 e 11 entre-nós, respectivamente (0,5x); R-rizoma; H-hilo; os olhos estão numerados por ordem de formação, estando representados a tracejado os olhos do lado oposto do tubérculo. Adaptado de Cutter (1992).

Após o início da formação do tubérculo, ocorre um aumento considerável no número de células e do volume celular, que no conjunto vão contribuir para a expansão do tubérculo, porém, não existe consenso àcerca das contribuições relativas destes dois fenómenos no crescimento dos tubérculos (Peterson *et al.*, 1985; Cutter, 1992). Plaisted (1957) verificou

que quando os tubérculos aumentavam de peso de 0,037g para 200g, o volume celular sofria um aumento de 10 vezes, enquanto que o número de células aumentava 500 vezes, o que de acordo com o autor, correspondia a um aumento diário no número de células por tubérculo de 11,7% e, considerou, que o crescimento do tubérculo estava mais directamente relacionado com o aumento do número de células, do que com o aumento do volume celular. Em contraste, Reeve *et al.* (1973a,b) mostraram que nas cultivares Kennebec e Russet Burbank o principal processo que contribuía para o crescimento do tubérculo, até estes atingirem 30-40g era o aumento do número de células, sendo o crescimento ulterior devido predominantemente a um aumento do volume celular.

Um estudo sobre o desenvolvimento e estrutura do tubérculo, realizado por Peterson *et al.* (1985), levou os autores a concluírem que o crescimento de um tubérculo é inicialmente resultado do aumento do volume das células da medula, seguido rapidamente de divisões celulares, as quais ocorrem predominantemente no parênquima perimedular e parênquima cortical interno, sendo o tamanho final do tubérculo conseguido, principalmente, devido ao aumento do tamanho celular.

Factores que controlam a tuberização

A tuberização na batateira é controlada por diversos factores ambientais, principalmente pelo fotoperíodo. A resposta ao fotoperíodo interactua com outros factores incluindo a temperatura, o genótipo, a intensidade luminosa, o nível de azoto e a idade fisiológica dos tubérculos-mãe (Koda *et al.*, 1988 e referências; Ewing, 1990 e referências).

A indução da tuberização ocorre em condições de dias curtos, baixas temperaturas nocturnas e elevados níveis de irradiação. A formação dos tubérculos é também favorecida por baixos níveis de fertilização azotada e pela idade dos tubérculos-mãe que devem ser "fisiologicamente velhos" (Ewing, 1990 e referências)[1]. Embora este conjunto de condições ambientais se apliquem na generalidade a todos os genótipos de batateira, há uma enorme

[1]De acordo com Ewing (1987; 1990), a idade fisiológica dos tubérculos parece ser controlada não só pela sua idade cronológica, mas também pelas condições de armazenamento; tubérculos fisiologicamente jovens são aqueles que após a colheita são armazenados por curtos períodos de tempo, a temperaturas relativamente baixas, por exemplo 4°C. Os tubérculos tornam-se fisiologicamente velhos pelo armazenamento a baixas temperaturas durante períodos de tempo mais longos ou alternativamente durante menos tempo a temperaturas moderadas.

variação genética no grau de sensibilidade às referidas condições. Alguns genótipos são capazes de tuberizar em condições de luz contínua, desde que as condições de temperatura e irradiação sejam satisfatórias, enquanto outros genótipos debaixo das mesmas condições de temperatura e irradiação não tuberizam, a não ser que as plantas sejam expostas a fotoperíodos de 12 horas; os primeiros genótipos têm um fotoperíodo longo crítico para a tuberização e, os últimos, um fotoperíodo curto crítico (Ewing, 1990 e referências).

De acordo com a hipótese de Gregory (1956), nas condições indutoras da tuberização, iria formar-se nas folhas um estímulo específico da tuberização que era transmitido à parte subterrânea da planta e, nesse local, iria induzir a tuberização. Embora se conheça muito pouco sobre o transporte do estímulo, não existem dúvidas de que é transmíssivel por enxertia (Gregory, 1956; Chapman, 1958), o que dá suporte à hipótese de que esse estímulo seja de natureza química e do tipo hormonal (Stallknecht, 1985; Vreugdenhil & Struik, 1989; Ewing, 1990).

Efeito das fito-hormonas na tuberização

O papel das fito-hormonas tem sido considerado em vários trabalhos (Melis & van Staden, 1984; Ewing, 1985; Stallknecht, 1985; Vreugdenhil & Struik, 1989; Ewing, 1990) e, a tuberização, na globalidade, parece ser controlada pela acção combinada de várias hormonas vegetais (Koda & Okazawa, 1988).

Os resultados que têm sido obtidos são consistentes com o conceito de que a indução da tuberização é acompanhada por uma diminuição na actividade endógena das giberelinas. O envolvimento destas fito-hormonas na tuberização foi confirmado, quer pela aplicação de giberelinas exógenas a plantas intactas, quer em estudos *in vitro* (Ewing, 1990 e referências). Foi demonstrado que o ácido giberélico inibe a acumulação de patatina (Hannapel *et al.*, 1985), uma proteína cuja síntese está associada com a tuberização (Paiva *et al.*, 1983). Esta influência do efeito da giberelina na tuberização, permitiu formular a hipótese de o estímulo da tuberização ser um antagonista da giberelina, tendo sido sugerido que esse estímulo poderia ser, eventualmente o ácido abcísico (El-Antably *et al.*,

1967; Krauss & Marschner, 1982). Por outro lado, os resultados obtidos relativamente ao papel do ácido abcísico na indução da formação dos tubérculos são variáveis e controversos, não sendo portanto provável a sua função como inibidor do efeito das giberelinas. Em relação às citocininas existe muita informação na literatura que sugere que esta fito-hormona tem um papel importante na indução da tuberização (Melis & van Staden, 1984 e referências; Ewing, 1990); no entanto, segundo estes autores, os dados não são suficientes para concluir que as citocininas constituem o estímulo necessário para que ocorra a tuberização. A actividade das citocininas aumenta substancialmente à medida que os tubérculos vão crescendo, o que leva a supor que a presença destas fito-hormonas é necessária para induzir a divisão celular que ocorre durante o crescimento do tubérculo (Koda & Okazawa, 1988; Ewing, 1990). O envolvimento das auxinas na tuberização não tem sido muito estudado (Melis & van Staden, 1984), sendo provável que a sua função seja a de exercer algum controlo sobre o crescimento diageotrópico dos rizomas e tubérculos (Kumar & Wareing, 1972). Relativamente ao etileno não existem indicações de alterações na sua actividade endógena, porém, verificou-se que *in vitro* é capaz de inibir a tuberização (Vreugdenhil & van Dijk, 1989). Ewing (1990) sugere que o etileno intervém na interrupção do crescimento em extensão do rizoma, durante o processo de formação dos tubérculos.

Actualmente considera-se que a tuberização na batateira é controlada pelo ácido tuberónico e seu glicosídeo, ambos sintetizados nas folhas desta planta em condições de dias curtos (Koda & Okazawa, 1988; Koda *et al.*, 1988) e muito activos na indução da tuberização *in vitro* (Koda *et al.*, 1988). O ácido tuberónico é quimicamente semelhante ao ácido jasmónico (Yoshihara *et al.*, 1989), sendo este também muito activo na indução da formação de tubérculos (Koda *et al.*, 1991; Pelacho & Mingo-Castel, 1991; Koda *et al.*, 1992). Adicionalmente foi já demonstrado o envolvimento do ácido jasmónico na tuberização de plantas do inhame (*Dioscorea batatas* Decne.) (Koda & Kikuta, 1991) e de *Helianthus tuberosus* L. (Koda *et al.*, 1994). Recentemente, demonstrou-se que o ácido jasmónico é activo na indução da expansão celular em discos de tubérculos, actividade que parece

estar associada com a capacidade dos jasmonatos induzirem a formação dos tubérculos (Takahashi *et al.*, 1994).

As poliaminas, consideradas por alguns autores como uma nova classe de reguladores de crescimento (Beraud *et al.*, 1992), estão também associadas com a tuberização da batateira, tendo sido sugerido por Feray *et al.* (1992) que as poliaminas, tal como as fito-hormonas, têm um papel regulador no transporte a longa distância. Resultados obtidos por Protacio & Flores (1992) mostraram que as poliaminas são necessárias para a formação de tubérculos *in vitro*, provavelmente na fase inicial da morfogénese do tubérculo, que envolve divisão celular activa.

Influência da nutrição azotada na formação e crescimento do tubérculo

Como referido anteriormente, uma das condições ambientais que influencia a formação dos tubérculos é a nutrição azotada. Em condições de dias curtos e baixas temperaturas nocturnas o início da tuberização no campo pode ser retardado pela aplicação de doses elevadas de fertilizante azotado. Estes resultados foram confirmados em condições controladas, quer com plantas intactas, quer com estacas caulinares (Krauss, 1985 e referências). Efectivamente, a tuberização pode ser manipulada facilmente e com precisão pela nutrição azotada. Assim, em condições climáticas indutoras de fotoperíodo e temperatura (20°C e 12 h de luz), a tuberização é completamente inibida quando o azoto é fornecido continuamente à planta, enquanto que uma interrupção do fornecimento de azoto (fornecimento descontínuo) promove a tuberização (Krauss & Marschner, 1982). Os mesmos autores verificaram que em condições climáticas não indutoras, tais como dias longos (18 h de luz) ou temperaturas elevadas (30°C) a tuberização não ocorria, ainda que o azoto fosse fornecido descontinuamente à planta. Esta resposta é completamente independente da fonte de azoto, obtendo-se resultados comparáveis, quer quando ele é fornecido sob a forma de ião nitrato, quer sob a forma de ião amónio.

Se após se ter iniciado a tuberização for fornecida à planta uma dose excessiva de azoto, há uma interrupção no crescimento do tubérculo e verifica-se que ocorre subsequentemente

o abrolhamento de alguns gomos que crescem como rizomas, como está ilustrado na Fig. 9. Quando estas plantas são transferidas para uma solução nutriente sem azoto, verifica-se que os tubérculos já existentes são incapazes de crescer; contudo, pode ocorrer, quer o desenvolvimento de tubérculos na extremidade dos rizomas (Fig. 10), quer o crescimento dos rizomas como novo tecido de reserva (Fig. 11), dando origem a tubérculos deformados. Em qualquer uma das situações, os tubérculos que já estavam formados perdem as suas propriedades como orgãos de reserva, desempenhando apenas a função de orgãos de passagem, enquanto que os tubérculos recém formados passam a prevalecer como orgãos de reserva (Krauss, 1985). A repetição do procedimento descrito, pode levar à formação de tubérculos em rosário (Fig. 12), o que evidencia, como já referimos, que a alimentação azotada controla com muita precisão a indução da tuberização e o crescimento dos tubérculos (Krauss, 1985), sendo sugerido por este autor, que o controlo mediado pela nutrição azotada, resulta de alterações nos níveis endógenos das fito-hormonas.

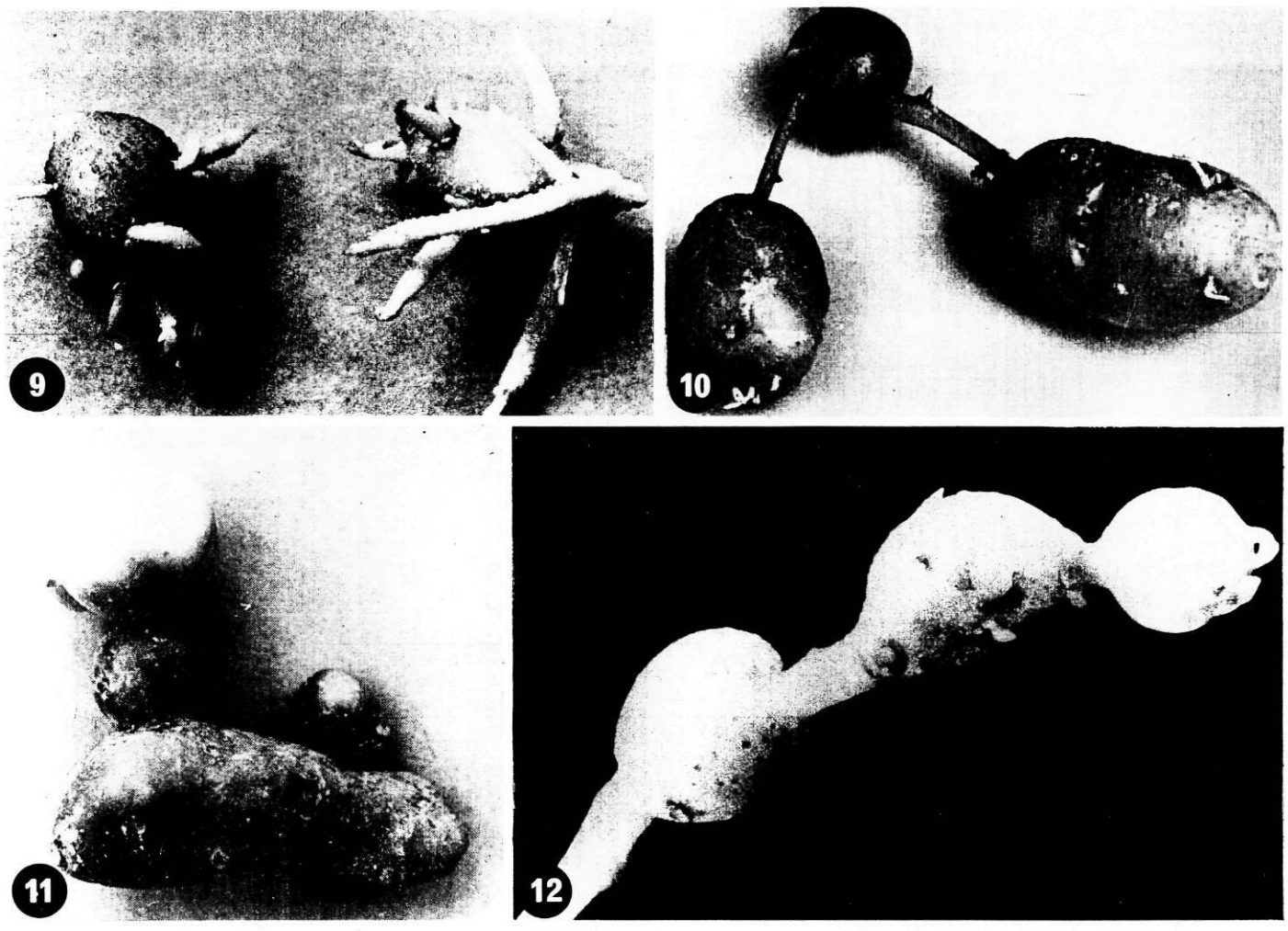


Fig. 9 - Abrolhamento dos tubérculos induzido por uma excessiva fertilização azotada após o início da tuberização.

Fig. 10 - Desenvolvimento de tubérculos na extremidade dos rizomas.

Fig. 11 - Crescimento dos rizomas como novo tecido de reserva, dando origem a um tubérculo "nodoso".

Fig. 12 - Tuberização em rosário, resultante de três ciclos de fornecimento alternado de azoto.

Figs. 9 a 12 - Reproduções de Krauss (1985).

Síntese de amido

O amido é um importante produto final da fixação fotossintética do CO_2, sendo o estudo da sua biossíntese objecto de intensa investigação (Preiss, 1982; 1988; Mares *et al.*, 1985; Beck & Ziegler, 1989; Anderson *et al.*, 1990). Grande parte da informação relativa ao metabolismo do amido é proveniente de estudos com tecido foliar, onde esta via biossintética se encontra bastante estudada. Em contraste, são escassos os conhecimentos sobre o metabolismo do amido em orgãos de reserva não fotossintéticos, como é o caso do tubérculo da batateira (Anderson *et al.*, 1990).

A enzima ADP-glucose pirofosforilase desempenha um papel importante na síntese do amido que ocorre no cloroplasto, cujo mecanismo de regulação foi descrito na página 28, salientando-se a importância da razão 3-PGA/Pi. Aumentos nesta razão coincidem com a síntese de amido durante o dia (períodos de iluminação), enquanto que decréscimos na razão 3-PGA/Pi estão relacionados com a diminuição da síntese de amido e sua mobilização durante a noite (períodos de obscuridade) (Nakata *et al.*, 1994).

Embora os amiloplastos e os cloroplastos tenham uma ontogenia comum, podendo os amiloplastos transformar-se em cloroplastos e vice-versa (Badenhuizen & Salema, 1967; Zhu *et al.*, 1984), estudos recentes mostraram que o controlo do metabolismo do amido nos tecidos de reserva não fotossintéticos, como sementes e tubérculos, não é semelhante ao controlo que ocorre nas folhas. Ao contrário das flutuações diurnas no metabolismo deste hidrato de carbono nas folhas, nos orgãos de reserva como é o caso dos tubérculos, a síntese e degradação de amido são temporalmente separadas em fases bem distintas do desenvolvimento da planta; o amido sintetizado durante a tuberização não serve como uma reserva imediata de energia ou de carbono, sendo somente mobilizado durante a fase de abrolhamento do tubérculo (Anderson *et al.*, 1990). Por outro lado, enquanto que o cloroplasto é autónomo, quer do ponto de vista energético, quer relativamente à produção de compostos carbonados, o amiloplasto é dependente, quer da fonte de carbono, quer de energia, importados do citoplasma (Ngernprasirtsiri *et al.*, 1989; Okita, 1992; Nakata *et al.*, 1994).

Durante o processo de tuberização, a sacarose constitui a principal fonte de carbono para a síntese do amido (Preiss, 1982). A sacarose é transportada das células foliares para as células do tubérculo via floema (Giaquinta, 1980) e, nestas células, a sacarose pode ser desdobrada, quer pela sacarose sintase, quer pela invertase. Apesar dos tubérculos conterem invertases, os seus níveis são muito baixos comparativamente com a actividade da sacarose sintase, admitindo-se que as invertases têm apenas um papel secundário na hidrólise da sacarose que é transportada para os tubérculos (Sung *et al.*, 1989). Considera-se, portanto, que a reacção catalizada pela sacarose sintase é a que predomina no desdobramento da sacarose (Fig. 13, reacção 1) (Sung *et al.*, 1989; Müller-Röber *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1994; Zrenner *et al.*, 1995), formando-se UDP-glucose e frutose. A UDP-glucose é ulteriormente metabolizada pela UDP-glucose pirofosforilase (Fig. 13, reacção 2) para produzir glucose 1-fosfato, que juntamente com ATP vai dar origem a ADP-glucose. Esta reacção (Fig. 13, reacção 3) é catalizada pela ADP-glucose pirofosforilase, a enzima que é considerada como sendo a enzima chave na síntese do amido (Preiss,1988). Recentemente trabalhos realizados em batateira, por Müller-Röber *et al.* (1992), nos quais foram utilizadas plantas transgénicas, em que a expressão da ADP-glucose pirofosforilase foi inibida utilizando a técnica do RNA de sentido contrário (antisense), demonstraram claramente que a síntese do amido via ADP-glucose é a via predominante, senão a única, envolvida na biossíntese do amido nas plantas (Müller-Röber *et al.*, 1992).

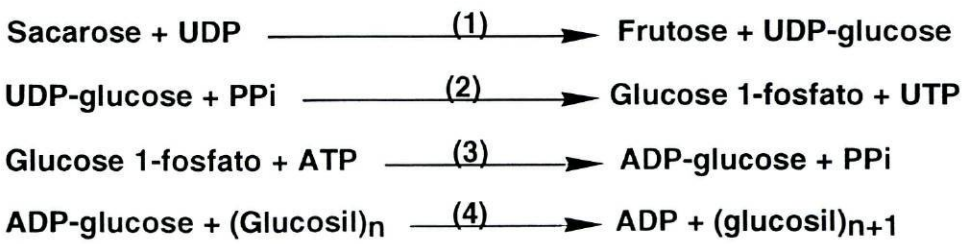


Fig. 13 - Principais reacções da biossíntese do amido. (1) - sacarose sintase, (2) - UDP-glucose pirofosforilase, (3) - ADP-glucose pirofosforilase, (4) - amido sintase. Adaptado de Anderson *et al.* (1990).

Müller-Röber *et al.* (1992) verificaram que a redução da actividade da ADP-glucose pirofosforilase em plantas transgénicas, era acompanhada por uma redução do conteúdo em amido dos tubérculos e, curiosamente, os níveis de açucares solúveis, especificamente sacarose e glucose, apareciam significativamente aumentados. Por outro lado, o aumento da actividade da ADP-glucose pirofosforilase em tubérculos de plantas transformadas exprimindo um único gene da ADP-glucose pirofosforilase de *Escherichia coli*, conduzia a um aumento da quantidade de amido (Stark *et al.*, 1992).

As reacções de desdobramento de sacarose e as da síntese do amido, assim como os passos intermédios entre estes dois processos são bem conhecidos nos tecidos fotossintéticos, ao contrário do que acontece nos orgãos de reserva. Existem opiniões divergentes relativamente ao tipo de açucares que são transportados do citoplasma para o amiloplasto, uma vez que os resultados que têm sido obtidos não são conclusivos.

Alguns estudos sugerem que são trioses fosfato os açucares transportados através das membranas do invólucro do amiloplasto (Echeverria *et al.*, 1988; Mohabir & John, 1988), tendo sido sugerido por Mohabir & John (1988) a existência no invólucro dos amiloplastos, de um translocador triose fosfato/fosfato inorgânico semelhante ao dos cloroplastos. Todavia, esta parece não ser a via principal pela qual o carbono entra no plastídio (Okita, 1992). Vários trabalhos dão suporte à hipótese que são hexoses monofosfato e não trioses fosfato, que efectivamente são transportadas para o amiloplasto (Kelling *et al.*, 1988; Tyson & ap Rees, 1988; Heldt *et al.*, 1991; Hill & Smith, 1991). A observação do transporte de unidades de hexose para o interior de amiloplastos de tubérculos de batateira, sementes de *Vicia faba* L.(Viola *et al.*, 1991), endosperma de milho e células em suspensão de *Chenopodium rubrum* L. (Hatzfeld & Stitt, 1990) conduziu a conclusões semelhantes.

Apesar da falta de consenso àcerca da fonte de carbono que é transportada para o interior de amiloplasto, foi recentemente admitido por Okita (1992) que o fluxo de carbono do citoplasma para o amiloplasto não envolve trioses fosfato; em vez destes intermediários, Okita (1992) sugere que hexoses monofosfato resultantes do desdobramento sucessivo

da sacarose e da UDP-glucose são directamente transportadas para o amiloplasto, onde são convertidas em amido através da acção combinada da ADP-glucose pirofosforilase e amido sintase (Fig. 14), admitindo-se actualmente, que de acordo com os resultados que têm sido obtidos, este é o modelo mais aceitável para a biossíntese do amido (Smith *et al.*, 1995).

Resultados de estudos genéticos e bioquímicos obtidos por Müller-Röber *et al.* (1992), levaram estes investigadores a excluírem uma via alternativa para a síntese do amido, anteriormente proposta por Pozueta-Romero *et al.* (1991a,b), baseada na capacidade dos cloroplastos e amiloplastos importarem ADP-glucose. De acordo com este modelo, quer os cloroplastos, quer os amiloplastos, possuíam um translocador ADP/ATP que era também capaz de transportar ADP-glucose. Os autores sugeriram que no citoplasma seria sintetizada ADP-glucose, a partir directamente de sacarose por acção de sacarose sintase, sendo subsequentemente transportada para o interior dos amiloplastos/cloroplastos, onde podia ser utilizada pela enzima amido sintase.

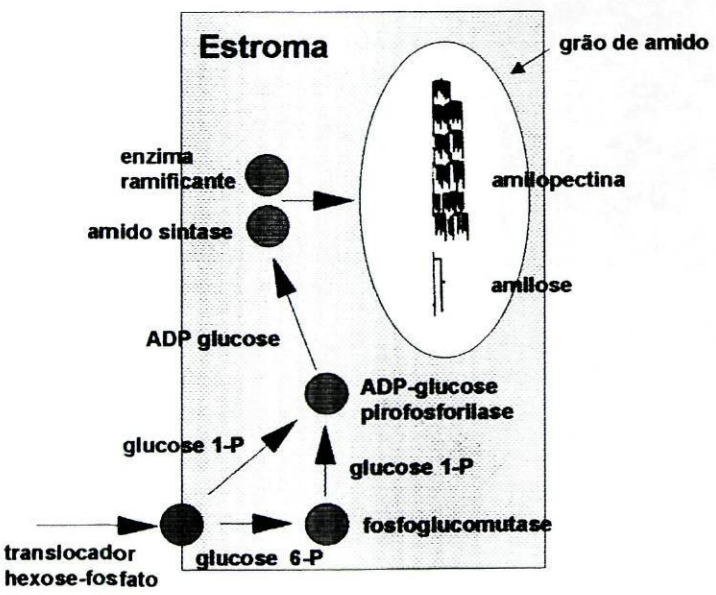


Fig. 14 - Principais reacções da biossíntese do amido num amiloplasto de um orgão de reserva. A hexose-fosfato entra para o amiloplasto, onde é convertida em ADP-glucose no estroma, via ADP-glucose pirofosforilase. A partir de ADP-glucose forma-se amilose e amilopectina, via amido sintase e enzima ramificante. Adaptado de IPSR & JIC (1994).

Acumulação de proteínas de reserva

Durante a tuberização, paralelamente às alterações anatómicas e hormonais, ocorrem alterações bioquímicas (Ewing & Struik, 1992). Uma das primeiras alterações bioquímicas que surge é a deposição de amido (Duncan & Ewing, 1984), acompanhada por um aumento da actividade da ADP-glucose pirofosforilase (Sowokinos, 1976). Adicionalmente, nas fases iniciais do desenvolvimento do tubérculo, a concentração das principais proteínas de reserva aumenta significativamente (Ewing & Struik, 1992 e referências). Estas proteínas são representadas por uma família de glicoproteínas relacionadas imunologicamente, com uma massa molecular de cerca de 40 kDa, a que se deu o nome vulgar de patatina, por uma outra família de proteínas com a massa molecular aproximadamente de 22 kDa e pelas proteínas inibidor I e II da proteinase (Ewing & Struik, 1992 e referências; Müller-Röber *et al.*, 1992). Os estudos realizados com plantas transgénicas de batateira, (Müller-Röber *et al.*, 1992) mostraram que a inibição da biossíntese do amido e o concomitante aumento do conteúdo de sacarose e glucose nos tubérculos destas plantas, eram acompanhados por uma redução na expressão dos genes das principais proteínas de reserva, dando suporte à ideia de que a expressão dos genes destas proteínas está de algum modo relacionada com a formação dos hidratos de carbono nos tecidos de reserva. Os resultados obtidos neste estudo (Müller-Röber *et al.*, 1992) contrariam a hipótese de que a expressão dos genes da patatina e da proteína inibidor II da proteinase é induzida pela sacarose, como foi previamente sugerido por vários grupos de investigadores (Müller-Röber *et al.*, 1992 e referências).

∴

1.5. Culturas *in vitro* de *S. tuberosum* L.

Durante os últimos anos o método das culturas de tecidos vegetais atingiu elevada importância, uma vez que a sua aplicação a diferentes campos da biologia vegetal tem

permitido a aquisição de novos conhecimentos, em áreas como a morfologia, bioquímica, patologia e genética. Recentemente, tem havido uma expansão considerável no uso destas técnicas, num outro campo da biologia, conhecido como biotecnologia (Gautheret, 1985).

As culturas de tecidos têm sido usadas com muito sucesso em estudos relacionados com a batateira (Wang & Hu, 1985; Espinoza *et al.*, 1986; Bajaj, 1987), sendo *S. tuberosum* considerada como a principal planta com interesse económico, em que a biotecnologia foi aplicada com êxito (Bajaj, 1987). Durante muitos anos as técnicas de culturas *in vitro* têm sido utilizadas para melhorar a produção de batata através da micropropagação, eliminação de agentes patogénicos e microtuberização, bem como para aperfeiçoar os métodos para a conservação de germoplasma durante longos períodos de tempo (Bajaj, 1987; Dodds, 1990).

A cultura de meristemas foi a primeira técnica *in vitro* utilizada para a obtenção de plantas de batateira isentas de vírus e, baseia-se na observação, de que a região meristemática da extremidade caulinar (Morel & Martin, 1955) ou radicular está isenta de vírus (Bajaj & Dionne, 1966). Este método pode ser também aplicado em associação com termoterapia ou quimioterapia. As plantas regeneradas com a utilização desta técnica podem ser rapidamente propagadas *in vitro*, de modo a obter grande quantidade de material vegetal isento de vírus, a partir do qual podem ser produzidos tubérculos-semente certificados.

É também possivel regenerar plantas de batateira a partir de micrósporos, culturas de tecido caloso, células em suspensão, protoplastos isolados e de uma diversidade de explantes provenientes de diferentes regiões da planta (Ahloowalia, 1982; Shepard, 1982; Austin & Cassells, 1983; Espinoza & Dodds, 1985; Allicchio *et al.*, 1987; Tavazza *et al.*, 1988; Hulme *et al.*, 1992). Quando a regeneração das plantas é precedida pela formação de tecido caloso ocorrem frequentemente alterações genéticas, fenómeno designado variação somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981). Estas alterações podem ser úteis como um meio de melhorar os clones de batateira existentes (Quraishi, 1985; Espinoza *et al.*, 1986; Bajaj & Sopory, 1986), dado que pode acontecer que alguns dos variantes que surgem durante a regeneração, apresentem características que interessem preservar e que

possam ser exploradas comercialmente. A batateira parece ser muito propensa ao aparecimento destas variações somaclonais, encontrando-se referências na literatura à ocorrência de variação fenotípica acentuada em plantas regeneradas a partir de culturas de protoplastos, tecido caloso, anteras e discos de tubérculos (Shepard *et al.*, 1980; Cassells *et al.*, 1983; Sree Ramulu *et al.*, 1983; Quraishi, 1985; Wheeler *et al.*, 1985). A selecção de variantes somaclonais permite aumentar a diversidade de germoplasma, abrindo novas perspectivas nos programas de melhoramento da batateira.

Um outro contributo importante para a indução de variabilidade genética nesta planta, é a obtenção de híbridos somáticos, através da fusão de protoplastos (Fish & Jones, 1988). Depois dos trabalhos pioneiros de Melchers *et al.* (1978), em que foram conseguidos híbridos somáticos entre a batateira e o tomateiro, designados "pomato" ou "topato", a fusão de protoplastos interespecífica e a regeneração de híbridos somáticos entre *S. tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt. (Butenko & Kuchko, 1980), entre *S. tuberosum* L. x *S. brevidens* Phil. (Austin *et al.*, 1985; Fish *et al.*, 1987) e entre *S. tuberosum* L. x *S. nigrum* L. (Binding *et al.*, 1982), tem sido utilizada para introduzir resistência ao fungo *Phytophthora infestans*, ao vírus do enrolamento da batateira e a herbicidas, respectivamente.

A tecnologia *in vitro*, é também extremamente útil para a obtenção de plantas de um modo mais rápido e em maior número, do que através do método de propagação convencional da batateira, isto é, através de tubérculos. Os métodos mais correntemente utilizados no International Potato Center (Lima, Peru) para a regeneração de plantas através das técnicas de culturas *in vitro*, consistem na cultura em meio sólido de estacas caulinares possuindo apenas um gomo axilar, ou alternativamente, na cultura de estacas caulinares com vários gomos axilares, em meio líquido, com agitação (Fig. 15), sendo a velocidade de crescimento e multiplicação maior no meio líquido do que no meio solidificado com agar (Espinoza *et al.*, 1986; Bajaj, 1987). As estacas caulinares podem ser induzidas a enraízar e as plântulas obtidas, após aclimatização, podem ser plantadas no campo e multiplicadas. Em qualquer um dos métodos de micropropagação, o material vegetal utilizado é proveniente de pequenas plantas regeneradas *in vitro* e isentas de organismos patogénicos. Alternativamente, tem sido utilizada uma outra técnica que possibilita a

conservação de germoplasma e que é a criopreservação em azoto líquido (-196°C). Trabalhos desenvolvidos por Bajaj (1985) mostraram que meristemas criopreservados durante períodos de tempo, que variavam entre três meses e quatro anos, regeneravam plantas capazes de tuberizar normalmente. No mesmo trabalho, foi feito um estudo periódico da viabilidade dos meristemas criopreservados, tendo sido demonstrado que não havia diferença na viabilidade, entre a situação controlo e os meristemas congelados em azoto líquido. Em conclusão, estes resultados justificam a aplicação da criopreservação para a conservação da batateira durante longos períodos de tempo e constitui um meio que se revela extremamente útil e eficaz, para a troca internacional de germoplasma (Bajaj, 1987).

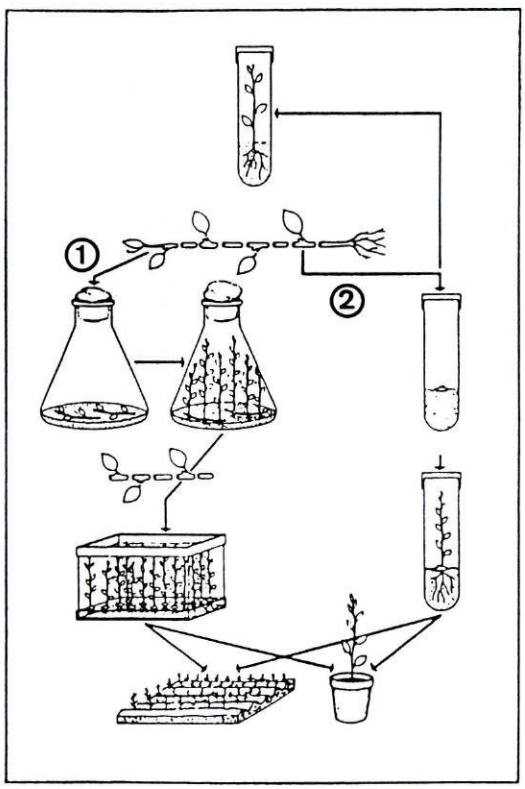


Fig. 15 - Esquema representativo da regeneração de plantas em meio líquido (1) e em meio sólido (2). Adaptado de Espinoza *et al.* (1986).

Uma outra utilização das técnicas *in vitro* é a produção de microtubérculos. Os tubérculos obtidos *in vitro* devido ao facto de terem dimensões e peso reduzidos, cerca de 1 cm de diâmetro (Wang & Hu, 1985) e pesando entre 3 e 38 mg como refere Bajaj (1987), são facilmente armazenados e transportados, além de que é possível a sua produção

independentemente da época do ano. O material vegetal usado para a microtuberização são geralmente plântulas regeneradas *in vitro* em meio líquido e, após a colocação destas plântulas em meio indutor da tuberização, são necessárias apenas cerca de cinco semanas para a obtenção de tubérculos fisiologicamente maduros (Fig. 16) (Espinoza *et al.*, 1986). Os tubérculos produzidos *in vitro* são morfologicamente iguais aos produzidos no campo em relação à forma e cor, sendo também semelhante o padrão electroforético das proteínas de reserva (Espinoza *et al.*, 1986).

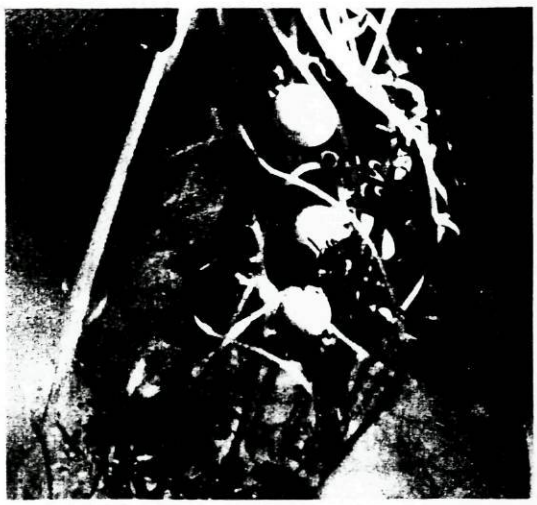


Fig. 16 - Formação de tubérculos *in vitro*. Reproduzido de Espinoza *et al.* (1986).

No International Potato Center o método de microtuberização está bastante desenvolvido, sendo os tubérculos produzidos, normalmente utilizados, quer para a distribuição internacional de germoplasma, quer como uma componente adicional aos métodos tradicionais de propagação rápida, usados no programa de produção de tubérculos-semente (Dodds, 1990). A produção de mini-tubérculos a partir de plântulas regeneradas *in vitro*, é também utilizada com êxito, no nosso País, pela BIOROPE (Empresa Europeia de Biotecnologia, S.A.) (comunicação pessoal - Eng. Cecília Araújo).

Tradicionalmente, para a manutenção de clones de batateira, o germoplasma é preservado através de tubérculos; este método, para além de ser muito trabalhoso e moroso, é também algo arriscado, porque o material vegetal é exposto às condições ambientais, podendo ocorrer perdas, devido a doenças e/ou pragas ou outras causas naturais (Wang & Hu, 1985; Espinoza *et al.*, 1986; Bajaj, 1987). Alternativamente, as técnicas de culturas *in vitro* são também utilizadas para a conservação de germoplasma. No armazenamento de germoplasma têm sido usadas culturas de tecido caloso, culturas de meristemas e plântulas conservadas *in vitro*. Um dos principais obstáculos ao uso de culturas de tecido caloso com este objectivo, é a ocorrência de variabilidade genética, o que impede a conservação dos clones. Embora esta dificuldade possa ser ultrapassada pela cultura de meristemas, este método é apenas eficaz para a conservação de germoplasma durante períodos de tempo que não sejam demasiado longos, dado que é necessária a transferência do material vegetal para meio de cultura fresco e uma certa vigilância das condições de cultura (Bajaj, 1987).

Na última década tem sido dada atenção especial à engenharia genética, que constitui um potencial enorme no melhoramento, quer da produção, quer da qualidade dos tubérculos (Dodds, 1990). A batateira é uma das plantas com importância agrícola, que pode ser infectada com *Agrobacterium tumefaciens*, permitindo com facilidade obter plantas transformadas geneticamente (Mitten *et al.*, 1990 e referências). Através da engenharia genética foi já possível produzir plantas transgénicas de batateira exprimindo vários tipos de características agronómicas de interesse, incluindo resistências a agentes patogénicos (vírus, fungos e bactérias) e a insectos (Bajaj & Sopory, 1986; Peferoen, 1990; Dodds, 1990; Vayda & Belknap, 1992). No entanto, o aspecto mais aliciante relacionado com a obtenção de batateiras transgénicas é o de modificar as características qualitativas dos tubérculos. Por exemplo, uma das principais características usadas para avaliar o valor comercial das batatas, é o seu teor em amido total ou quantidade total de matéria seca (Vayda & Belknap, 1992); recentemente, a companhia norte americana Monsanto Inc., conseguiu produzir plantas transgénicas da cv. Russet Burbank, com o teor em sólidos

enriquecido em 5% (Vayda & Belknap, 1992 e referências), aspecto que é particularmente importante para a indústria.

Vayda & Belknap (1992) referem que as plantas transgénicas de batateira que se têm produzido demonstram não haver alteração das características transgénicas em testes de campo realizados nos anos subsequentes e que, as características qualitativas da cultivar parental, se mantêm nas plantas transgénicas numa elevada frequência.

A batata (exprimindo variadas características de interesse) foi mesmo referida como um dos primeiros produtos agrícolas transgénicos, a vir a ser comercializado durante a década de 90 (Vayda & Belknap, 1992).

O uso das culturas *in vitro* como modelo experimental para certo tipo de estudos fisiológicos e bioquímicos é de grande utilidade (Fukuda *et al.*, 1994). De acordo com Yeoman & Aitchison (1973), as culturas de tecidos são uma fonte de material relativamente homogéneo, que pode ser facilmente manipulado e obtido em grande quantidade, num ambiente controlado. Estas condições são díficeis de reunir quando são usadas plantas intactas como sistemas experimentais e, por isso, as técnicas de culturas *in vitro* são frequentemente utilizadas, nomeadamente para o estudo a nível celular e molecular de fenómenos fisiológicos das plantas superiores (Fukuda *et al.*, 1994)

Desde 1976 (Shaw *et al.*, 1976) que é reconhecida a utilidade das culturas de tecido caloso derivado de tubérculos de batateira, como modelo experimental para o estudo do metabolismo dos hidratos de carbono nestes orgãos de reserva. Tecido caloso proveniente de tubérculos, em resposta à temperatura, apresenta alterações no conteúdo dos açucares e amido, de uma maneira aproximadamente paralela às que ocorrem nos tubérculos (Muneta *et al.*, 1990; Hagen *et al.*, 1991). Recentemente Hagen & Muneta (1993) ao estudarem o efeito da temperatura no conteúdo de hidratos de carbono, actividades das enzimas ADP-glucose pirofosforilase e fosfofrutocínase em tecido caloso proveniente de tubérculos, concluíram, do mesmo modo, que o tecido caloso derivado de tubérculo constitui um modelo de estudo fiável para investigar o metabolismo dos hidratos de carbono.

A utilização das culturas de tecidos de batateira como modelo experimental para o estudo de situações adversas provocadas por sais, está também documentada na literatura (Naik & Widholm, 1993); no entanto, de entre as culturas de segmentos caulinares, raízes isoladas e células em suspensão, apenas as culturas de raízes mostraram um comportamento semelhante ao das plantas intactas na resposta a este tipo de situação adversa.

Culturas de células em suspensão são referidas como uma alternativa atractiva ao uso das plantas intactas para estudos do metabolismo dos agroquímicos (Cole, 1994). Contudo, nestes sistemas experimentais de culturas em suspensão, a instabilidade genética que dá origem à variação somaclonal, significa que pode ocorrer a perda de certas capacidades metabólicas com o decorrer do tempo (Cole, 1994); por isso, um dos cuidados a ter é evitar o uso de culturas estabelecidas há muito tempo. De facto, parece que as culturas mantidas durante vários anos perdem progressivamente e selectivamente a capacidade de metabolizarem pesticidas (Cole & Owen, 1987).

A indução e produção de tecido caloso com sucesso é dependente do estado fisiológico do tecido no momento em que o explante é isolado, assim como dos níveis das hormonas endógenas presentes no orgão ou no tecido, a partir do qual o explante é retirado. Verifica-se na generalidade que as culturas de tecido caloso apresentam um crescimento mais rápido, se o explante é obtido de regiões jovens e fisiologicamente mais activas (Lindsey & Yeoman, 1985). Adicionalmente, outros factores importantes na indução da formação de tecido, são a época do ano em que o explante é removido assim como o seu tamanho e também as características juvenis ou adultas da planta (Lindsey & Yeoman, 1985).

O desenvolvimento de tecido caloso a partir de um fragmento de tecido envolve uma fase inicial de indução em que as células se preparam para a divisão, o metabolismo é activado e o tamanho celular permanece constante. A duração desta fase, designada fase de lactência, varia com o estado fisiológico das células do explante e com as condições de cultura. Segue-se uma fase de síntese activa e diminuição do tamanho médio celular devido à ocorrência de divisões celulares, que estão restritas às células das camadas periféricas

do explante, mantendo-se uma pequena zona central de células que não sofrem divisão (Yeoman & Aitchison, 1973). Durante a fase de divisão celular, ocorre um retorno progressivo a um estado meristemático, assistindo-se portanto a uma desdiferenciação. A fase seguinte, designada fase estacionária, em que um novo padrão de crescimento é imposto, é caracterizada pela cessação da divisão e crescente diferenciação celular (Yeoman & Aitchison, 1973). No caso particular de espécies de solanáceas em cultura, a fase estacionária está associada com o início da organização estrutural das células que, por sua vez, está frequentemente associada com o aumento da produção de metabolitos secundários (Lindsey & Yeoman, 1985).

A indução e produção de tecido caloso com êxito é dependente das condições de cultura empregues, sendo fundamental a composição do meio nutritivo. A base de todos os meios nutritivos é uma mistura de sais minerais, combinando os macro- e micro-elementos essenciais, juntamente com uma fonte de carbono, que é geralmente a sacarose. Contudo, esta composição relativamente simples, não é suficiente para estabelecer ou manter grande parte dos tecidos em cultura e, por isso, é necessário adicionar aos meios nutritivos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crescimento, bem como extractos naturais, como por exemplo, leite de côco. É importante ter presente que um meio nutritivo adequado para a indução de tecido caloso a partir de determinado explante, poderá não ser conveniente para a manutenção da cultura (Yeoman, 1973).

∴

1.6. Objectivos

Sendo a batateira susceptível a um elevado número de doenças e pragas, o controlo destas é um pré-requesito para que seja possível manter a produtividade da cultura. Na prática agrícola são utilizados regularmente produtos fitofarmacêuticos para prevenir e/ou

combater as doenças e pragas, sendo, actualmente, a aplicação de pesticidas aceite como um meio indispensável de salvaguardar as produções agrícolas.

Apesar de ter sido desenvolvida investigação que permitiu conhecer o modo de acção de tais drogas nos organismos contra os quais são utilizadas (Corbett *et al.*, 1984 e referências), o seu efeito na fisiologia das plantas tratadas tem sido objecto de muito pouco estudo. Contudo, as plantas são capazes de metabolizar compostos estranhos tóxicos, incluindo pesticidas agrícolas, que muitas vezes são estruturalmente relacionados com intermediários do metabolismo secundário (Cole, 1994). De acordo com este autor, os mecanismos bioquímicos de defesa das plantas aos pesticidas envolvem transformações de natureza oxidativa. No entanto, é importante conhecer as alterações a nível fisiológico, bioquímico e ultraestrutural que podem eventualmente surgir, quando as plantas são submetidas durante o seu crescimento no campo a condições adversas, resultantes do emprego de produtos agroquímicos e, quais as repercussões destes tratamentos, a nível da produtividade e da qualidade nutricional dos tubérculos.

O objectivo do nosso trabalho foi o de conhecer certos aspectos do comportamento fisiológico da batateira crescida no campo, em resposta aos tratamentos com agroquímicos, correntemente utilizados pelos agricultores. Neste estudo foram usados dois fungicidas, um de contacto (Shell Mancozebe® 80) e um sistémico (Ridomil® MZ 72), normalmente utilizados no controlo do fungo responsável pela doença do míldio e um insecticida (Decis®) frequentemente empregue para combater o escaravelho da batateira.

O crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas são condicionados pela actividade de três vias metabólicas interdependentes, vias essas que são as responsáveis pela redução e assimilação do azoto, a fotossíntese e a respiração. Devido à primordial importância destas vias no metabolismo da batateira, realizaram-se estudos a nível bioquímico de alguns parâmetros das referidas vias metabólicas, bem como um estudo ultraestrutural das células de mesófilo foliar. A nível ultraestrutural foi dada particular atenção ao estudo das alterações nos cloroplastos, atendendo a que é nestes organelos que ocorrem grande parte das reacções das vias metabólicas que foram abordadas a nível bioquímico.

Dada a importância dos tubérculos na alimentação humana, foi apreciada a repercussão dos tratamentos foliares dos pesticidas no produto final, através da quantificação da produtividade e da qualidade nutricional. Dado que os fungicidas utilizados eram compostos que continham zinco e manganésio, foram feitas quantificações destes iões nos tubérculos, para avaliar se eram translocados para estes orgãos de reserva.

O estudo foi realizado com culturas de campo de *S. tuberosum* L. cv. Désirée. Durante o crescimento das plantas foram efectuados tratamentos fitossanitários anti-míldio e anti-escaravelho, tendo sido os agroquímicos aplicados nas doses recomendadas e de acordo com o Serviço de Avisos da Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro-e-Minho, seguindo o esquema correntemente empregue pelos agricultores.

Com o objectivo de avaliar o grau de correlação existente entre a resposta de plantas de batateira crescidas no campo - sistema *in vivo* - aos tratamentos com agroquímicos e a do tecido caloso estabelecido - situação *in vitro* - foram feitos estudos semelhantes (bioquímicos e ultraestruturais) aos realizados nas folhas, em tecido caloso crescido na presença do insecticida e de um dos fungicidas, de modo a conhecer a possibilidade da utilização deste sistema experimental para estudos sobre situações adversas provocadas com agroquímicos, de um modo análogo a situações já referidas (Muneta *et al.*, 1990; Hagen *et al.*, 1991; Hagen & Muneta, 1993; Naik & Widholm, 1993). No caso de se encontrar elevado grau de correlação, seria possível o uso do sistema *in vitro* como modelo experimental, para a abordagem de certos efeitos de agroquímicos usados correntemente na cultura desta importante planta e dispôr de material ao longo do ano, ultrapassando-se uma dificuldade inerente ao caracter sazonal da cultura da batateira, o que se revelaria de grande utilidade prática.

O grande valor económico da batateira, associado ao facto de se tratar da segunda planta mais tratada por pesticidas, logo a seguir ao algodoeiro (Raman & Radcliffe, 1992), justificam o interesse por esta planta e pelo tema abordado. Além disso, embora muitos dos fungicidas correntemente usados sejam eficazes no controlo das doenças fúngicas, sendo impossível quantificar a importância dos fungicidas, mas que é sem dúvida significativa,

calculando-se perdas nas colheitas da ordem dos 30% devido a fungos patogénicos (De Waard *et al.*, 1993), é de grande interesse conhecer as respostas das plantas a este tipo de situação adversa provocada pela aplicação de agroquímicos. Esta questão torna-se ainda mais relevante, uma vez que existe uma forte tendência para que os fungicidas sejam utilizados em doses excessivas, obviamente com efeitos nocivos no ambiente e na saúde pública (De Waard *et al.*, 1993; Jansma *et al.*, 1993).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foram utilizadas folhas e tubérculos, provenientes de plantas de *Solanum tuberosum* L. crescidas no campo. A cultivar seleccionada - a cv. Désirée - é uma das mais usadas no nosso País e também no resto da Europa (Snyder & Ewing, 1989).

O estudo foi complementado com a utilização de uma cultura estabelecida de tecido caloso derivado de explantes foliares da mesma planta.

2.2. Localização e arranjo das parcelas de terreno

Durante cinco anos consecutivos - nas Primaveras de 1988 a 1992 - as parcelas foram delineadas nos terrenos da Quinta de S. Gens, na Unidade de Exploração Agrícola da Senhora da Hora (Matosinhos).

A análise do solo, realizada em amostras colhidas antes da instalação da cultura, mostrou que o terreno tinha quantidades de fósforo e potássio suficientes para atingir uma boa produção, pelo que não foi recomendada a sua aplicação; relativamente ao azoto, foi indicada a aplicação de 145 kg/ha.

O estabelecimento da cultura foi delineado de forma a instalar 4 modalidades e 2 repetições, consideradas em número suficiente para o objectivo em vista e tendo presente as características homogéneas do terreno. Cada talhão tinha a área de 23,5 m^2 (6,70 m x 3,50 m), separados entre si por "ruas" com cerca de 3 m (Fig. 17), para assegurar que o produto aplicado às plantas de um talhão não interferisse nas plantas de outro.

2.3. Preparação do terreno, plantação e cuidados culturais

A cultura foi instalada na Primavera, após uma sementeira de Outono de tremocilha, que foi posteriormente enterrada na altura da floração (sideração). O terreno foi então preparado com uma lavoura e uma gradagem e, de seguida, tratado com o fumigante Vapan® (N-metilditiocarbamato de sódio) (Permutadora), na concentração de 1 dm^3/10 dm^3 de água/10 m^2, numa área de 700 m^2 com o objectivo de eliminar infestantes, fungos e nemátodos presentes no solo (Hartmann & Kester, 1975). Após cerca de 30 dias o terreno foi novamente gradado.



Fig. 17 - Aspecto geral das plantas no campo (cv. Désirée), onde se podem observar vários talhões de ensaio.

A adubação azotada foi aplicada no acto da plantação, de uma só vez, em fundo, localizada no rego e a cerca de 5 cm da linha de plantação; foram aplicados cerca de 150 kg/ha de azoto nas formas nitríca e amoniacal, o que corresponde a 750 kg/ha de adubo (20,5% de azoto), tendo sido usado o produto Nitrolusal® (Quimigal).

Os regos foram abertos com um abridor de regos, à profundidade de cerca de 10 cm e a plantação dos tubérculos-semente foi feita manualmente, num compasso de 0,70 x 0,35 m (distância na entre-linha e na linha, respectivamente), equivalente a uma plantação de 40816 tubérculos por hectare; foram usados tubérculos abrolhados, com 35/45 mm de calibre, com peso médio de 50 g e de origem holandesa. O arrasamento do terreno foi feito manualmente.

O terreno foi mantido limpo de infestantes e convenientemente arejado através de sachas manuais, que foram efectuadas sempre que necessário. Durante o desenvolvimento da cultura e, normalmente em simultâneo com a 1ª sacha, procedeu-se à amontoa. A frequência da rega, que foi feita em sulcos, bem como a quantidade de água aplicada, dependeram do desenvolvimento da cultura e das condições meteorológicas.

No fim do ciclo cultural, a colheita dos tubérculos fez-se à enxada, após o corte da parte aérea das plantas.

2.4. Tratamentos fitossanitários

Neste trabalho estudou-se o efeito de três produtos agroquímicos, dois fungicidas e um insecticida, usados correntemente na agricultura. Os fungicidas que foram usados são empregues na prevenção e/ou combate ao fungo responsável pela doença do míldio (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) e, o insecticida, é utilizado no combate ao escaravelho da batateira (*Leptinotarsa decemlineata* Say).

- **Fungicidas**

  Shell Mancozebe® 80 (Shell) - acção de contacto, actua como preventivo

  Concentração: 0,2% (p/v), equivalente à aplicação de 2 kg de p.c.[1]/ha (1600 g de i.a.[2]/ha)

---

[1]p.c. - Produto comercial

[2]i.a. - Ingrediente activo

Composição: 80% de mancozebe - complexo do ião zinco com manebe [etileno bis - (ditiocarbamato) de manganésio], contendo 20% de Mn e 2,5% de Zn

Tipo de formulação: pó molhável

Este fungicida, de origem americana (Rohm & Haas, Company), pertence ao grupo dos ditiocarbamatos e, foi lançado no mercado em 1961, particularmente para ser usado no controlo do míldio da batateira (Martin & Worthing, 1976).

Ridomil® MZ 72 (Ciba-Geigy) - acção sistémica, actua como preventivo e curativo

Concentração: 0,25% (p/v), equivalente à aplicação de 2,5 kg de p.c./ha [1600 g de i.a./ha (mancozebe) + 200 g de i.a. /ha (metalaxil)]

Composição: 64% de mancozebe + 8% de metalaxil [$C_{15}H_{21}NO_4$ ou D,L - N (2,6-dimetil fenil) - N - (2´metoxi acetil) alalinato de metilo]

Tipo de formulação: pó molhável

O Ridomil® MZ 72 é uma combinação de um fungiciada de contacto, o mancozebe, com um fungicida sistémico, o metalaxil. Este fungicida de origem suiça (Ciba-Geigy S.A.) pertence à família química das fenilamidas.

- **Insecticida**

Decis® (Hoechst) - actua por contacto e ingestão

Concentração: 0,03% (v/v), equivalente à aplicação de 30 cm^3 de p.c./hl de água (7,5 g de substância activa/ha)

Composição: 25g/dm^3 de deltametrina [$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ ou (S) - α - ciano - m - fenoxibenzil (1R, 3R) - 3 - (2,2 - dibromovinil) - 2,2 - dimetilciclopropanocarboxilato]

Tipo de formulação: concentrado para emulsão

Este insecticida pertence ao grupo dos piretróides e foi lançado no mercado em 1976, em França, pela Roussel Uclaf. Impôs-se no mercado nacional pela sua eficácia em controlar várias pragas, nomeadamente o escaravelho da batateira.

Para a aplicação dos pesticidas, que foi sempre realizada de manhã (normalmente, entre as 9 h e as 10 h), utilizou-se um pulverizador motorizado, de dorso, de jacto projectado.

Os tratamentos fitossanitários foram realizados nas doses recomendadas e de acordo com o Serviço de Avisos da Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro-e-Minho. As plantas dos diferentes talhões, devidamente identificados, foram sujeitas a 3 tratamentos com cada um dos agroquímicos seleccionados.

Para referenciar os tratamentos e a colheita de material vegetal (folhas e tubérculos), considerou-se à semelhança de vários autores (Millard & McKerron, 1986; Millard & Catt, 1988; Millard *et al.*, 1989; Olesinski *et al.*, 1989; Vos & Biemond, 1992), o número de dias após a emergência das plantas (dae). O dia em que cerca de 50% das plantas tinham emergido, foi considerado a data de emergência.

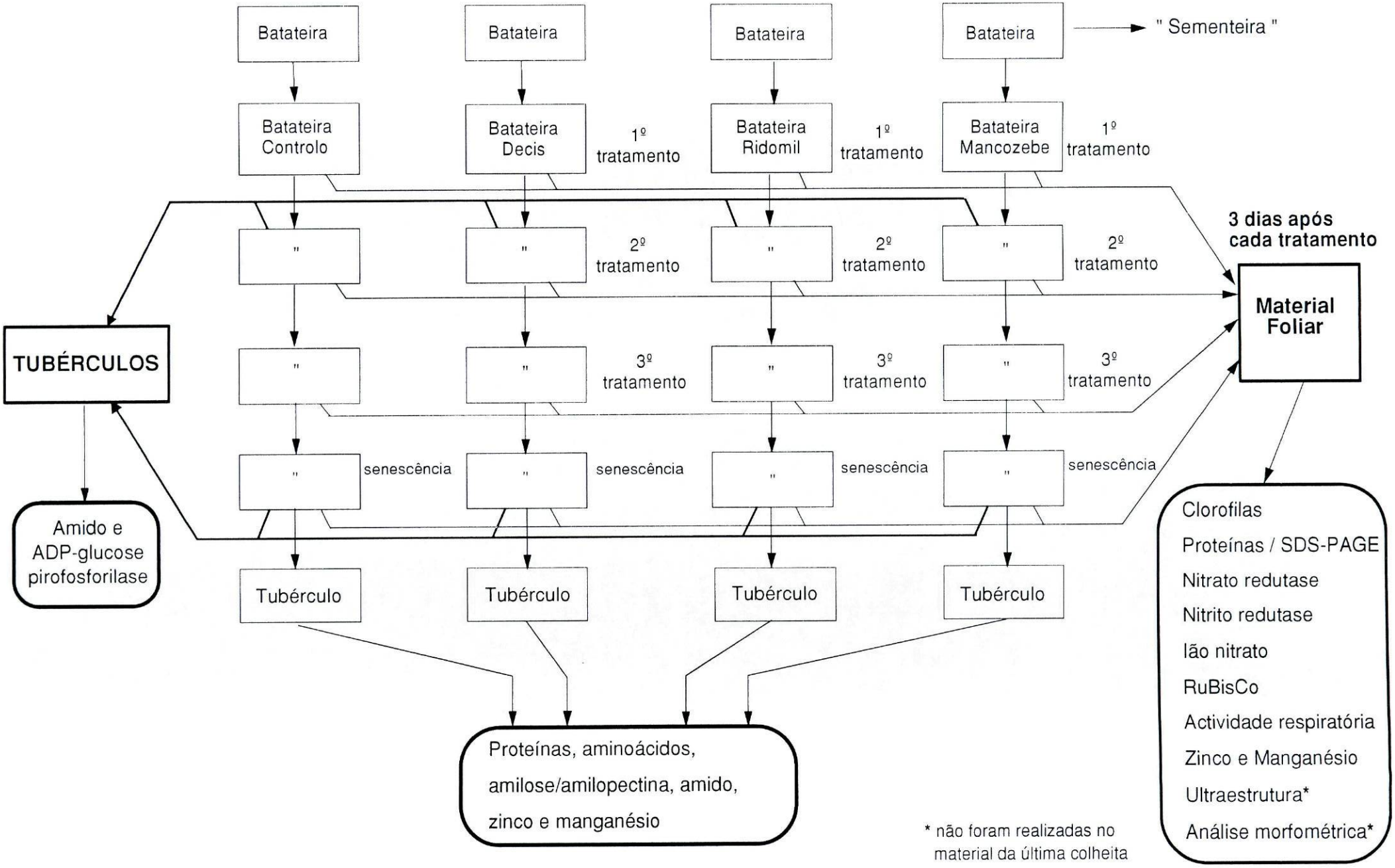
2.5. Colheita de material foliar

A colheita de material foliar dos quatro grupos de plantas, foi realizada 3 dias após cada uma das três pulverizações a que as plantas foram submetidas e também cerca de 15 dias depois do último tratamento, altura em que as plantas já apresentavam sinais de senescência. O Diagrama 1 mostra as diferentes situações em estudo, as colheitas realizadas e no lado direito referem-se os estudos realizados no material foliar.

A colheita das amostras no campo, realizou-se sempre entre as 9 h e as 10 h; foram selecionadas 4 a 6 plantas por repetição e tratamento e, de cada planta, foram utilizadas a 3ª e a 4ª folhas a partir do ápice. O material vegetal foi convenientemente acondicionado para o transporte até ao laboratório.

O material foliar foi usado para determinações bioquímicas e estudo ultraestrutural. Material fresco era processado de imediato para microscopia electrónica de transmissão e utilizado para as determinações da actividade respiratória e da actividade da enzima nitrato redutase, utilizando o ensaio *in vivo*. O restante material colhido era congelado em azoto líquido e depois armazenamento a -80°C. O material foliar destinado à determinação da actividade da enzima ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase era mantido em azoto líquido até ser analisado.

DIAGRAMA 1


Batateira
Batateira
Batateira
Batateira
" Sementeira "
Batateira Controlo
Batateira Decis
1º tratamento
Batateira Ridomil
1º tratamento
Batateira Mancozebe
1º tratamento
"
"
2º tratamento
"
2º tratamento
"
2º tratamento
3 dias após cada tratamento
Material Foliar
TUBÉRCULOS
"
"
3º tratamento
"
3º tratamento
"
3º tratamento
"
"
senescência
"
senescência
"
senescência
"
senescência
Amido e ADP-glucose pirofosforilase
Tubérculo
Tubérculo
Tubérculo
Tubérculo
Proteínas, aminoácidos, amilose/amilopectina, amido, zinco e manganésio
Clorofilas
Proteínas / SDS-PAGE
Nitrato redutase
Nitrito redutase
lão nitrato
RuBisCo
Actividade respiratória
Zinco e Manganésio
Ultraestrutura*
Análise morfométrica*
* não foram realizadas no material da última colheita

2.6. Estudos em folhas

Determinações bioquímicas

- Clorofilas

Numa fase inicial do trabalho, a extracção das clorofilas a e b foi realizada de acordo com o método descrito por Hiscox & Israelstam (1979). As folhas foram cortadas em pequenas porções (sem homogeneização) e colocadas em DMSO[3] a 65°C, durante 5 h; após arrefecimento, os extractos foram convenientemente diluídos e as absorvâncias lidas a 645 nm e 663 nm. O teor em clorofilas foi calculado utilizando as equações de Amon (1949):

$$\text{Cl a } (mg/dm^3) = 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}$$
$$\text{Cl b } (mg/dm^3) = 22,8 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}$$
$$\text{Cla + Cl b } (mg/dm^3) = 8,02 \cdot A_{663} + 20,21 \cdot A_{645}$$

Ulteriormente, optou-se pela extracção e quantificação dos pigmentos de acordo com a técnica de Hodgins & van Huystee (1986), usando-se como solvente acetona a 80% contendo 1% (v/v) de amoníaco em solução (25%). Após homogeneização do material foliar, o extracto foi mantido a 4°C, na obscuridade durante 30 min e centrifugado a 3000 x g durante 10 min; o sobrenadante foi recolhido e o sedimento resultante foi ressuspenso no mesmo solvente e mantido nas mesmas condições (4°C e obscuridade) durante 15 min. O sobrenadante obtido nesta 2ª extracção foi adicionado ao obtido inicialmente, efectuando-se de seguida leituras de absorvâncias a 645 nm e a 663 nm. As concentrações das clorofilas a e b, expressas em mmoles/dm^3, foram calculadas a partir dos valores das absorvâncias a 645 nm e 663 nm e dos coeficientes de extinção milimolar das clorofilas a e b aos comprimentos de onda considerados.

Pigmento	Comprimento de onda (nm)	Coeficiente de extinção milimolar ($mM^{-1}\ cm^{-1}$)
Clorofila a	663	73,30
Clorofila b	645	41,38

[3]DMSO - Dimetilsulfóxido

- Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo; EC 4.1.1.39)

Preparação do extracto enzimático

Amostras de folhas foram homogeneizadas num almofariz contendo areia de quartzo, no meio de homogeneização modificado de Suzuki *et al.* (1987b), com a seguinte composição: tampão Tricina-KOH[4] 50 mM pH 8,0, contendo cloreto de magnésio 10 mM, Na_2-EDTA[5] 1 mM, PVP[6] 1% (p/v), mercaptoetanol 10 mM, hidrogenocarbonato de sódio 10 mM e PMSF[7] 0,12 mM. O extracto foi centrifugado a 15900 x g durante 90 s, à temperatura ambiente e o sobrenadante usado para o ensaio enzimático.

Activação e ensaio da RuBisCo

A determinação da actividade da RuBisCo foi precedida pela activação da enzima, de acordo com o método descrito por Delaney & Walker (1978). A actividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente, a 25°C, pela diminuição da absorvância a 340 nm, de acordo com Lilley & Walker (1974), com algumas alterações. A mistura de reacção num volume final de 1 cm^3, continha: 40 µL do extracto enzimático, tampão Hepes[8] 50 mM pH 7,8, cloreto de potássio 10 mM, Na_2-EDTA 1 mM, cloreto de magnésio 15 mM, NADH[9] 0,21 mM, DTT[10] 5 mM, ATP[11] 5 mM, hidrogenocarbonato de sódio 10 mM, fosfocreatina 5 mM, 2 unidades creatina fosfocinase, 15 unidades de fosfocínase do 3-fosfoglicerato e 5 unidades de desidrogenase do fosfogliceraldeído. Após a incubação a 20°C durante 5 min (activação da enzima), a reacção enzimática foi desencadeada pela adição de 0,5 µmoles de ribose-5-fosfato.

Para exprimir a actividade da enzima com base no teor de clorofilas (a+b), foram usados 0,5 cm^3 de homogeneizado para determinação da quantidade destes pigmentos, de acordo com o método de Arnon (1949).

---

[4]Tricina-KOH - N-tris (hidroximetil) metilglicina, com pH ajustado com hidróxido de potássio (KOH)
[5]Na_2-EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético disódico
[6]PVP - Polivinilpirrolidona
[7]PMSF - Fenilmetilsulfonil fluoreto
[8]Hepes - 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-ácido etanosulfónico
[9]NADH - Nicotinamina adenina dinucleótido (forma reduzida)
[10]DTT - Ditiotreitrol
[11]ATP - Adenosina 5-trifosfato

- Proteínas

Para fazer a extracção e quantificação das proteínas totais (solúveis e insolúveis), amostras de folhas foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl[12] 0,06 M, pH 6,8 e o extracto foi centrifugado a 3000 x g, durante 15 min; o sobrenadante obtido foi usado para a quantificação das proteínas solúveis de acordo com Peterson (1977). O sedimento obtido foi ressuspenso no mesmo tampão contendo SDS[13] 2,5% (p/v), e a suspensão resultante incubada durante 3 h a 4°C seguido de 1 h à temperatura ambiente. Após centrifugação a 3000 x g durante 15 min, as proteínas insolúveis foram quantificadas pelo mesmo método.

O método de Peterson (1977), que foi usado para as quantificações das proteínas solúveis e insolúveis, é uma modificação ao método de Lowry *et al.* (1951) e utiliza os seguintes reagentes e procedimento:

- solução de cobre-tartarato-carbonato (solução CTC): uma solução de carbonato de sódio 20% (p/v) é adicionada lentamente, com agitação, a uma solução de sulfato de cobre em tartarato de potássio, de modo a obter-se concentrações finais de sulfato de cobre 0,1% (p/v), tartarato de potássio 0,2% (p/v) e carbonato de sódio 10% (p/v).
- reagente A: misturar partes iguais das soluções CTC, NaOH 0,8 M, SDS 10% (p/v) e água desionizada
- reagente B: 1 volume de reagente de Folin-Ciocalteus é misturado com 5 volumes de água desionizada

Em tubo de ensaio misturou-se 1 cm^3 de amostra convenientemente diluída com 1 cm^3 do reagente A; após 10 min à temperatura ambiente, adicionou-se 0,5 cm^3 do reagente B a ao fim de 20 min a absorvância foi lida a 750 nm.

Um outro método utilizado na quantificação das proteínas solúveis (nomeadamente na determinação das proteínas nos extractos enzimáticos) foi o método de Bradford (1976), de acordo com o procedimento seguinte:

- em "cuvette" de espectrofotómetro misturou-se 0,1 cm^3 de amostra com 1 cm^3 de reagente de Bradford (10 mg de Azul de Coomassie G-250 dissolvidos em 5 cm^3 de etanol a 95% e adicionados a 10 cm^3 de ácido fosfórico a 85% (p/v); a solução

[12]Tris-HCl - Tris (hidroximetil) aminometano, com pH ajustado com ácido clorídrico (HCl)
[13]SDS - Dodecil sulfato de sódio

resultante foi diluída para um volume final de 100 cm^3 com água desionizada, de seguida filtrada e guardada na obscuridade a 4°C)

- após 15 min à temperatura ambiente foram feitas leituras de absorvância 595 nm

As rectas padrão de proteínas foram construídas com albumina sérica bovina (BSA).

- Nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1)

A actividade da nitrato redutase, determinada *in vivo* foi realizada de acordo com Chanda *et al.* (1987), com algumas alterações.

Após pesagem das folhas, o material foi cortado em pequenos fragmentos e colocado em meio de incubação com a seguinte composição: tampão fosfato de potássio 80 mM pH 7,5 contendo nitrato de potássio 50 mM e 1% de Triton X-100 (v/v). Depois de remover uma amostra para a determinação dos nitritos, outra amostra foi incubada na obscuridade e em condições anaeróbias, a 30°C. Após 30 min de incubação, a reacção foi terminada pela adição de acetato de zinco (concentração final 75 mM) e colocação dos tubos de reacção em água fervente, durante 5 min; esta fervura para além de parar a reacção, também facilita a extracção completa dos nitritos do tecido. Após arrefecimento, procedeu-se a centrifugação a 2000 x g durante 10 min e ao sobrenadante adicionou-se fenazina metossulfato (concentração final 13,6 µM), para oxidação completa do NADH residual. Depois de 20 min a 30°C, foram retiradas alíquotas de 3 cm^3, a que se adicionou 1 cm^3 de SFA[14] 1% (p/v em HCl 1 M) e 1 cm^3 de NPTL[15] 0,02% (p/v), para determinação colorimétrica dos nitritos; ao fim de 10 min à temperatura ambiente a absorvância foi lida a 540 nm.

Para construção da recta padrão usou-se nitrito de sódio.

- Nitrito redutase (NiR; EC 1.7.7.1)

Preparação do extracto enzimático

Fragmentos de folha foram homogeneizados a 0-4°C num almofariz contendo areia de quartzo, tendo sido utilizado o meio de extracção com a seguinte composição: tampão

---

[14]SFA - Sulfanilamida
[15]NPTL - Naftiletilenodiamina

fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 contendo Na_2-EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, cisteína 10 mM, 0,1% de Triton X-100 (v/v), PMSF 0,2 mM e PVP 1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 20000 x g durante 10 min (0-4°C) e o sobrenadante usado para a determinação da actividade enzimática.

Actividade da NiR

A actividade enzimática foi testada de acordo com Vega *et al.* (1980). A mistura de reacção continha 0,5 cm^3 do extracto enzimático, tampão Tris-HCl 75 mM pH 8,0, nitrito de sódio 2 mM, metilviologénio 0,75 mM e 7,5 mg de ditionito de sódio (25 mg/cm^3 em hidrogenocarbonato de sódio 0,29 M), num volume final de 2 cm^3. O branco foi preparado com todos os reagentes da mistura, substituindo-se o extracto enzimático por água desionizada. Após 10 min de incubação a 30°C, a reacção foi terminada por forte agitação num "vortex", até o ditionito ser completamente oxidado e a mistura de reacção se tornar incolor. Esta foi convenientemente diluída e, a alíquotas de 3 cm^3 foram adicionados 1 cm^3 de SFA 1% (p/v em HCl 1 M) e 1 cm^3 de NPTL 0,02% (p/v), para a determinação colorimétrica dos nitritos; após 10 min à temperatura ambiente a absorvância foi lida a 540 nm.

A recta padrão foi construída utilizando-se nitrito de sódio.

- lão nitrato

O nitrato foliar foi extraído de material seco, com água a 50°C, durante 5 h, de acordo com o método descrito por Sage & Pearcy (1987). Após centrifugação do extracto a 1700 x g, durante 10 min à temperatura ambiente, o nitrato presente no sobrenadante foi determinado com um eléctrodo selectivo para o ião nitrato.

Para construção da curva padrão utilizou-se nitrato de potássio.

- Actividade respiratória

A actividade respiratória foi quantificada pela técnica manométrica, usando o aparelho de Warburg, de acordo com o método descrito por Laval-Martin & Mazliak (1979).

Das folhas das plantas foram cortados pequenos discos, que após terem sido pesados, foram colocados no compartimento principal dos frascos de reacção, tendo-se preparado 3 frascos para cada situação (controlo e 3 tratamentos); no compartimento central dos frascos foi colocada uma solução de hidróxido de potássio, com a finalidade de fixar todo o CO_2 resultante da respiração. Depois da adaptação dos frascos de reacção aos manómetros, estes foram colocados no aparelho de Warburg e, em intervalos de 10 min até 40 min, foram feitas leituras do nível do líquido manométrico. A quantidade de oxigénio consumido pelo material foliar, à temperatura de 25°C, foi determinada pela seguinte equação:

$$x = h \cdot k$$

em que:

x - quantidade de gás consumido (µL)
h - desnível do líquido manométrico (mm), já corrigido com as variações de pressão lidas no termobarómetro
k - constante do frasco de reacção

$$k = \frac{V_g\ 273/T + V_f\alpha}{Po}$$

sendo:
V_g - volume da fase gasosa (µL)
V_f - volume da fase líquida (µL)
T- temperatura absoluta (neste caso, T = 273 + 25°C)
Po - pressão normal de valor igual a 10000 mm de líquido de Broodie equivalente a 760 mm de Hg
α - coeficiente de solubilidade do gás considerado, nas condições de pressão e temperatura normais [$\alpha\ O_2$ (25°C) = 0,028]

- Zinco e Manganésio

A determinação de zinco e manganésio em folhas foi realizada por espectrofotometria de absorção atómica (FLAME AAS), como descrito por Pinta (1980), com ligeiras alterações. As leituras foram feitas num espectrofotómetro de absorção atómica Vaian 1250, com lâmpada de deutério e com chama ar-acetileno.

Para a construção das rectas padrão foram utilizadas soluções padrão de zinco e de manganésio (Titrisol®, Merck).

Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As proteínas solúveis e insolúveis foram separadas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE). As electroforeses foram realizadas em geles verticais usando o sistema descontínuo de Laemmli (1970), tendo sido utilizadas as unidades SE 280 e SE 600 da Hoefer. A malha do gel concentrador foi de 5% (acrilamida: *bis* acrilamida) e a do gel de separação foi de 10% (acrilamida: *bis* acrilamida).

Os reagentes para a preparação de 1 gel com malha de 5% (gel concentrador) e espessura de 1,5 mm, na unidade SE 280, foram os seguintes:

Acrilamida: *bis* acrilamida		670 µL
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8		1000 µL
Água desionizada		2189 µL
SDS 10% (p/v)		40 µL
APS[16] 2% (p/v), preparado no momento		100 µL
TEMED[17]		1 µL
	Volume final	4000 µL

Os reagentes para a preparação de 1 gel com malha de 10% (gel de separação) e espessura de 1,5 mm, na mesma unidade (SE 280), foram os seguintes:

Acrilamida: *bis* acrilamida		3000 µL
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8		2250 µL
Água desionizada		3433 µL
SDS 10% (p/v)		90 µL
APS 2% (p/v), preparado no momento		225 µL
TEMED		2,25 µL
	Volume final	≈ 9000 µL

[16]APS - Persulfato de amónio
[17]TEMED - Tetrametiletilenodiamina

Na unidade SE 600, foram utilizados os mesmos reagentes, mas em quantidades proporcionais aos referidos para a unidade SE 280, atendendo a que os volumes finais foram de 10 cm^3 para o gel concentrador e de 25 cm^3 para o gel de separação; na unidade SE 600 a espessura do gel foi de 1 mm.

O tampão electrólito tinha a seguinte composição: tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (p/v), pH 8,3. O tampão das amostras foi preparado com tampão Tris-HCl 187,5 mM, SDS 6% (p/v), β-mercaptoetanol 15% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (v/v) e glicerol 30% (v/v), pH 6,8. As amostras foram combinadas com este tampão (100 µL + 50 µL, respectivamente), fervidas a 100°C durante 8-10 min e centrifugadas a 8000 x g, imediatamente antes de serem aplicadas; em cada poço do gel foram aplicadas 10 µg de proteínas (amostras) e paralelamente aplicaram-se os marcadores de proteínas de baixa massa molecular (14,400 a 92,500 kDa - BIORAD).

As electroforeses foram realizadas com uma voltagem constante (600 V) e intensidade da corrente de 15 mA e 20 mA (SE 280 e SE 600, respectivamente) no gel concentrador e de 20 mA e 25 mA (SE 280 e SE 600, respectivamente) no gel de separação.

A fixação dos geles foi feita com metanol 50% (v/v), durante 2-24 h.

A coloração foi realizada com prata, utilizando o seguinte procedimento:

- imersão com agitação, durante 40 min numa solução de nitrato de prata [1 g de $AgNO_3$ em 35 cm^3 de água desionizada, contendo 1,75 cm^3 de amoníaco (25%) adicionado gota a gota com agitação, 25 cm^3 de NaOH 0,35% (p/v) e 60 cm^3 de metanol]
- lavagem em água desionizada (6-8 lavagens, cada 10 min)
- revelação com uma solução de formaldeído (0,125 cm^3 de formaldeído + 250 cm^3 de água desionizada)
- paragem da revelação, durante 10 min, numa solução de carbonato de sódio 3% (p/v), contendo 5% (v/v) de ácido cítrico 2,3 M.

Os geles foram analisados num processador de imagem Cybertech C S 1.

Microscopia electrónica de transmissão

Na preparação do material para observação a nível ultraestrutural utilizou-se o seguinte procedimento:

- pré-fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão Na-PIPES[18] 1,25%, pH 7,0-7,2 (Salema & Brandão, 1973), durante 1 h à temperatura ambiente, seguida de lavagem no mesmo tampão a 2,5%
- pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% em Na-PIPES 1,25%, pH 7,0-7,2, durante 1 h à temperatura ambiente (Salema & Brandão, 1973)
- desidratação utilizando séries ascendentes de álcool ou de acetona e inclusão em Epon 812
- realização de cortes ultrafinos num ultramicrótomo LKB Ultrotome III, utilizando facas de vidro ou de diamante e recolhidos em grelhas de cobre
- contrastação com uma solução saturada de acetato de uranilo em álcool a 50% com ácido acético a 1% (Valentine, 1965) e com solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963)
- observação dos cortes utilizando microscópios electrónicos Siemens Elmiskop IA e Zeiss EM C10; o registo das imagens foi efectuado em películas fotográficas Agfa-Gevaert 23D 56.

Análise morfométrica ultraestrutural

A análise morfométrica ultraestrutural foi realizada de acordo com o método utilizado por Santos & Salema (1983). Determinou-se o volume fracional do amido em relação aos cloroplastos (Vv am/clor) e destes organelos relativamente a uma malha (Vv clor/ma) de secção quadrada de 0,5 cm^2, registando o número de pontos de intersecção da malha quadriculada que ficavam contidos nos perfis das estruturas estudadas.

Neste estudo foram utilizadas cerca de 30 microfotografias de cada grupo de plantas, com ampliação final de 16000 x.

Para a comparação das médias foi usado o teste *t* de "Student", com um nível de significância de $P < 0,05$.

2.7. Colheita de tubérculos

Ao longo do processo de tuberização foram feitas colheitas de tubérculos aos 33 dae, com cerca de 18-20 g e, aos 77 dae, com cerca de 70-80 g; os tubérculos de ambas as colheitas foram utilizados para a quantificação bioquímica do amido e determinação da

[18]PIPES - 1,4-piperazina-bis (ácido etanosulfónico)

actividade da enzima ADP-glucose pirofosforilase, como está indicado no lado esquerdo do Diagrama 1 (pág. 62).

No fim do ciclo de cultura (cerca de 100 dae), procedeu-se à colheita dos tubérculos e, atendendo à sua quantidade, foram pesados nas instalações da Quinta de S. Gens (Unidade de Exploração Agrícola da Senhora da Hora), para avaliação da produtividade. De entre os tubérculos colhidos, foram sorteados alguns com cerca de 120-130 g, nos quais foi realizado um estudo bioquímico, através da quantificação do nível de proteínas totais, de aminoácidos livres, razão amilose/amilopectina, teor de amido e níveis de zinco e manganésio (consultar Diagrama 1). De cada tratamento, foram seleccionados 3-4 tubérculos com as dimensões referidas e de cada tubérculo foram isoladas 2-3 amostras; atendendo ao elevado número de amostras a analisar, recorreu-se frequentemente ao congelamento e armazenamento do material em azoto líquido.

2.8. Estudos em tubérculos

Determinações bioquímicas

- Proteínas totais

A extracção das proteínas totais foi realizada em secções transversais retiradas da região média dos tubérculos; as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,06 M pH 6,8 contendo SDS 2,5% (p/v), e os homogeneizados foram incubados durante 3 h a 4°C, seguido de 1 h à temperatura ambiente. Após centrifugação a 3000 x g durante 15 min, as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Peterson (1977), conforme referido anteriormente na página 65.

- Aminoácidos

A quantificação dos aminoácidos livres foi feita em amostras que foram colhidas nos tecidos externos ao anel vascular. As amostras foram tratadas com etanol a 80% (v/v), a 80°C durante 1 h; após centrifugação dos extractos a 3000 x g durante 15 min, à temperatura ambiente, o sobrenadante foi recolhido e o sedimento resultante foi novamente tratado com

etanol a 80%, durante 30 min. Depois de se voltar a centrifugar, juntaram-se os sobrenadantes e adicionou-se água desionizada até perfazer o volume final de 50 cm^3.

A quantidade de aminoácidos livres foi determinada de acordo com o método de Yemm & Cocking (1955). A alíquotas de 1 cm^3 foram adicionados 0,5 cm^3 de tampão citrato 0,2 M pH 5,0 e 1,2 cm^3 da solução de cianeto de potássio-metil cellosolve[19]-ninidrina[20]; após 15 min a 100°C, os tubos foram arrefecidos 5 min em água corrente, de seguida adicionou-se 3 cm^3 de etanol 60% (v/v) e a absorvância foi lida a 570 nm. O branco foi preparado com todos os reagentes da mistura, substituindo-se o extracto de aminoácidos por tampão citrato 0,2 M pH 5,0.

A recta padrão foi construída com leucina.

- Amilose/Amilopectina

A razão amilose/amilopectina foi determinada de acordo com a técnica descrita por Hovenkamp-Hermelink *et al.* (1988). Amostras de tubérculos, colhidas junto do anel vascular, depois de pesadas (10-50 mg de peso fresco), foram imersas em 0,5 cm^3 de ácido perclórico 45% (v/v) e cuidadosamente maceradas com uma vareta de vidro em tubo de ensaio. Após 10 min adicionou-se 8 cm^3 de água desionizada e centrifugou-se 60 s a 650 x g. Alíquotas de 4 cm^3 de sobrenadante foram misturadas com 5 cm^3 de solução de Lugol diluída[21] (1:2, v/v), e a absorvância foi lida de imediato a 550 nm e 618 nm.

A fracção de amilose (Am) foi calculada, utilizando a seguinte expressão:

$$Am\ (\%) = \frac{3,5 - 5,1\ R}{10,4\ R - 19,9} \times 100$$

em que:

R - razão entre os valores obtidos a 618 nm e 550 nm, ou seja, é a razão amilose/amilopectina

---

[19]Metil cellosolve - Monometil eter de etileno glicol

[20]Preparação da solução cianeto de potássio-metil cellosolve-ninidrina
Solução A-solução cianeto de potássio-metil celosolve: diluir 1cm^3 de cianeto de potássio 0,01
M para 50 cm^3 de metil cellosolve
Solução B-solução ninidrina-metil cellosolve: ninidrina 5% (p/v) em metil cellosolve
Misturar 25 cm^3 da solução A com 5 cm^3 da solução B; a mistura pode ser usada 12 h após a sua preparação

[21]Solução de Lugol: 2g KI + 1g I_2 em 300 cm^3 de água desionisada

Este método de determinação das quantidades relativas de amilose e amilopectina, combina a extracção do amido com ácido perclórico (Lustinec *et al.*, 1983) e a determinação da absorvância aos dois comprimentos de onda referidos após coloração com solução de Lugol e, baseia-se no facto, da amilose e da amilopectina apresentarem absorção máxima a 618 nm e 550 nm, respectivamente.

- ADP-glucose pirofosforilase (EC 2.7.7.27)

Preparação do extracto enzimático

Amostras de tubérculos colhidas junto ao anel vascular, foram homogeneizadas a 0-4°C num almofariz, tendo sido utilizado o meio de extracção de acordo com Guan & Janes (1991), com a seguinte composição: tampão Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, Na_2-EDTA 2 mM, EGTA[22] 2 mM, cloreto de magnésio 1 mM, cloreto de manganésio 1 mM e DTT 2 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 27000 x g, durante 20 min (0-4°C) e após a centrifugação, o sobrenadante foi usado para a determinação da actividade da ADP-glucose pirofosforilase e o sedimento para a quantificação do teor de amido.

Actividade da ADP-glucose pirofosforilase

A actividade enzimática foi determinada de acordo com Guan & Janes (1991), com algumas alterações. A mistura de reacção continha: 200 µL do extracto enzimático, tampão glicilglicina-NaOH 80 mM pH 8,0, cloreto de magnésio 10 mM, fluoreto de sódio 10mM, glucose-1,6-bisfosfato 0,1 mM, adenosina 5´-difosfoglucose (ADPG) 2 mM, ácido 3-fosfoglicérico 2 mM, DTT 3 mM e pirofosfato de sódio 1 mM, num volume final de 1 cm^3. A reacção foi iniciada pela adição do pirofosfato de sódio; após 10 min de incubação a 30°C, a produção de glucose-fosfato foi terminada pela fervura durante 1 min. A mistura foi centrifugada a 700 x g, durante 5 min e o sobrenadante foi usado para a determinação da quantidade de glucose-fosfato produzida. A mistura de reacção num volume final de 1 cm^3, continha 400 µL de extracto (sobrenadante), 5 unidades de fosfoglucomutase, 1 unidade

[22]EGTA - Ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo) tetraacético

de glucose-6-fosfato desidrogenase e NAD[23] 1,5 mM. A quantidade de glucose-fosfato foi determinada espectrofotometricamente a 30°C, pela variação da absorvância do NAD a 340 nm, com base no seu coeficiente de extinção (ε NAD = 6,22 mM^{-1} cm^{-1})

- Amido

A quantificação do amido foi realizada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1984). Amostras de tubérculos foram homogeneizadas num almofariz e incubadas com 1 cm^3 de HCl 8 M e 4 cm^3 de DMSO, a 60°C, durante 1 h. Após arrefecimento à temperatura ambiente adicionou-se cerca de 10 cm^3 de água desionizada e 1,5 cm^3 de NaOH 5 M; o pH da solução resultante foi ajustado para pH 4-5 com NaOH 1 M e juntou-se água desionizada até perfazer o volume final de 20 cm^3.

Para tubos eppendorf, pipetaram-se os volumes indicados na seguinte tabela:

	branco glucose (µL)	amostra glucose (µL)	branco amido (µL)	amostra amido (µL)	concentração final
solução citrato 50 mM, pH 4,6	200	200	200	200	31 mM
amiloglucosidase 145 unid./1000µL	-	-	20	20	9 unid./1000µL
amostra em solução	-	100	-	100	
água desionizada	120	20	100	-	

Após incubação da mistura a 55°-60°C durante 60 min e posterior arrefecimento à temperatura ambiente, centrifugou-se a 8000 x g durante 10 min. O sobrenadante foi recolhido directamente para "cuvette" e adicionaram-se nas quantidades e pela ordem indicadas, os seguintes reagentes:

[23]NAD - Nicotinamina adenina dinucleótido

- 1000 µL da solução de tampão trietanolamina 0,75 M + $MgSO_4$ 10 mM, pH 7,6
- 100 µL de β-NADP[24] 11,5 mM
- 100 µL de ATP 81 mM
- 1500 µL de água desionizada

Misturou-se bem e a absorvância foi lida a 340 nm até valor constante, o que ocorreu após cerca de 2-3 min. A reacção foi desencadeada pela adição de 20 µL da solução de hexocínase (280 unidades/cm^3) + glucose-6-fosfato desidrogenase (140 unidades/cm^3) e, após cerca de 15 min à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 340 nm. No caso de a reacção não ter terminado após os 15 min, o que aconteceu frequentemente, foram realizadas leituras de 5 em 5 min até cerca de 40 min.

A quantificação do amido foi realizada quer em amostras preparadas apenas com essa finalidade, procedendo-se à preparação de um homogeneizado como referido, quer em amostras em que se pretendeu, também, quantificar a actividade da enzima ADP-glucose pirofosforilase. Neste caso, a quantificação do amido foi feita no sedimento resultante da centrifugação realizada para obtenção do extracto enzimático e foi esse sedimento que se ressuspendeu em 1 cm^3 de HCl 8 M e 4 cm^3 de DMSO, procedendo-se de seguida conforme descrito anteriormente.

- Zinco e Manganésio

A determinação dos níveis de zinco e manganésio em tubérculos, foi realizada conforme referido para o material foliar, na página 68.

2.9. Cultura de tecido caloso

Indução e estabelecimento da cultura de tecido caloso

Folhas jovens obtidas de plantas de *S. tuberosum* (cv. Désirée), crescidas no campo, com cerca de 20 dae, foram desinfectadas em etanol 70% durante 5 min, hipoclorito de sódio 0,5% durante 5 min e, de seguida, lavadas em água desionizada e esterilizada. Em

[24]β-NADP - β-Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato

condições assépticas, as folhas foram cortadas em pequenas porções com cerca de 1 cm^2, após remoção da parte periférica. Como meios de cultura foram usados meios solidificados com 0,6% de agar (Sicomol) e com o pH ajustado para 5,7 com KOH 0,1M.

Os explantes foram cultivados no meio desenvolvido por Lam (1977). Este meio continha como composição básica os nutrientes inorgânicos do meio de Murashige & Skoog (1962) e orgânicos do meio de Nitsch & Nitsch (1969), como se indicam:

Compostos inorgânicos	mg/dm^3
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2$	332
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Fe-EDTA	40
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4.4H_2O$	22,3
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$CoSO_4.7H_2O$	0,025
Compostos orgânicos	mg/dm^3
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Tiamina	0,5
Biotina	0,05
Inositol	2,0
Glicina	5,0
Ácido fólico	0,5
Sacarose	20000

De acordo com Lam (1977), o meio foi suplementado com 0,1% (p/v) de hidrolisado de caseína. Ao meio de indução foram adicionados os seguintes reguladores de crescimento: ácido indolacético (IAA) 1,0 mg/dm^3, ácido naftaleno-acético (NAA), 0,2 mg/dm^3, cinetina (KIN) 1,0 mg/dm^3, benzilaminopurina (BA) 0,5 mg/dm^3, zeatina (ZEA) 0,4 mg/dm^3 e ácido giberélico (GA) 0,5 mg/dm^3.

O meio de manutenção tinha a mesma composição básica do meio de indução, tendo sido adicionados como reguladores de crescimento, uma auxina, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2 mg/dm^3 e, uma citocinina, a benzilaminopurina (BA), 0,5 mg/dm^3. Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos.

A cultura estabelecida de tecido caloso foi mantida em frascos de cultura com 100 cm^3 de meio de manutenção, à temperatura de 27°C em estufa de cultura, num fotoperíodo de 12 h de luz/ 12 h de obscuridade, com densidade de fluxo fotónico de 30 µmol m^{-2} s^{-1}, produzido por lâmpadas fluorescentes tipo "day light". Após cerca de 20-21 dias o tecido era subcultivado para meio fresco, para impedir a necrose e manter o crescimento do tecido.

Preparação dos meios de cultura suplementados com Decis® ou Ridomil® MZ 72

A fim de conhecer a concentração do insecticida Decis®, que devia ser utilizada no estudo com o tecido caloso de *S. tuberosum*, ensaiaram-se as concentrações de 0,001, 0,002, 0,003, 0,015, 0,03 e 0,06% (v/v) em Decis® no meio de manutenção. Atendendo a que a cultura de tecido caloso se mostrou insensível a nível macroscópico, à presença do insecticida em qualquer uma das concentrações ensaiadas, foi realizado o estudo (bioquímico e ultraestrutural) do efeito desta droga em tecido caloso cultivado em meio nutritivo contendo Decis®, em concentração igual à utilizada nos trabalhos de campo, ou seja, 0,03% (v/v).

Com a finalidade de determinar a concentração mínima inibitória (MIC-minimum inhibitory concentration) do fungicida Ridomil® MZ 72 relativamente ao fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, foi preparado meio de manutenção ao qual se adicionou o produto, nas concentrações de 0,021, 0,022, 0,023, 0,024, 0,025, 0,125 e 0,25% (p/v); as placas foram inoculadas com o fungo, proveniente de culturas de *P. infestans* em "potato dextrose agar". A mais baixa concentração de fungicida adicionada ao meio de manutenção que inibiu o crescimento do fungo (MIC) foi de 0,025% (p/v), tendo sido esta concentração utilizada, para estudar o efeito do fungicida no tecido caloso.

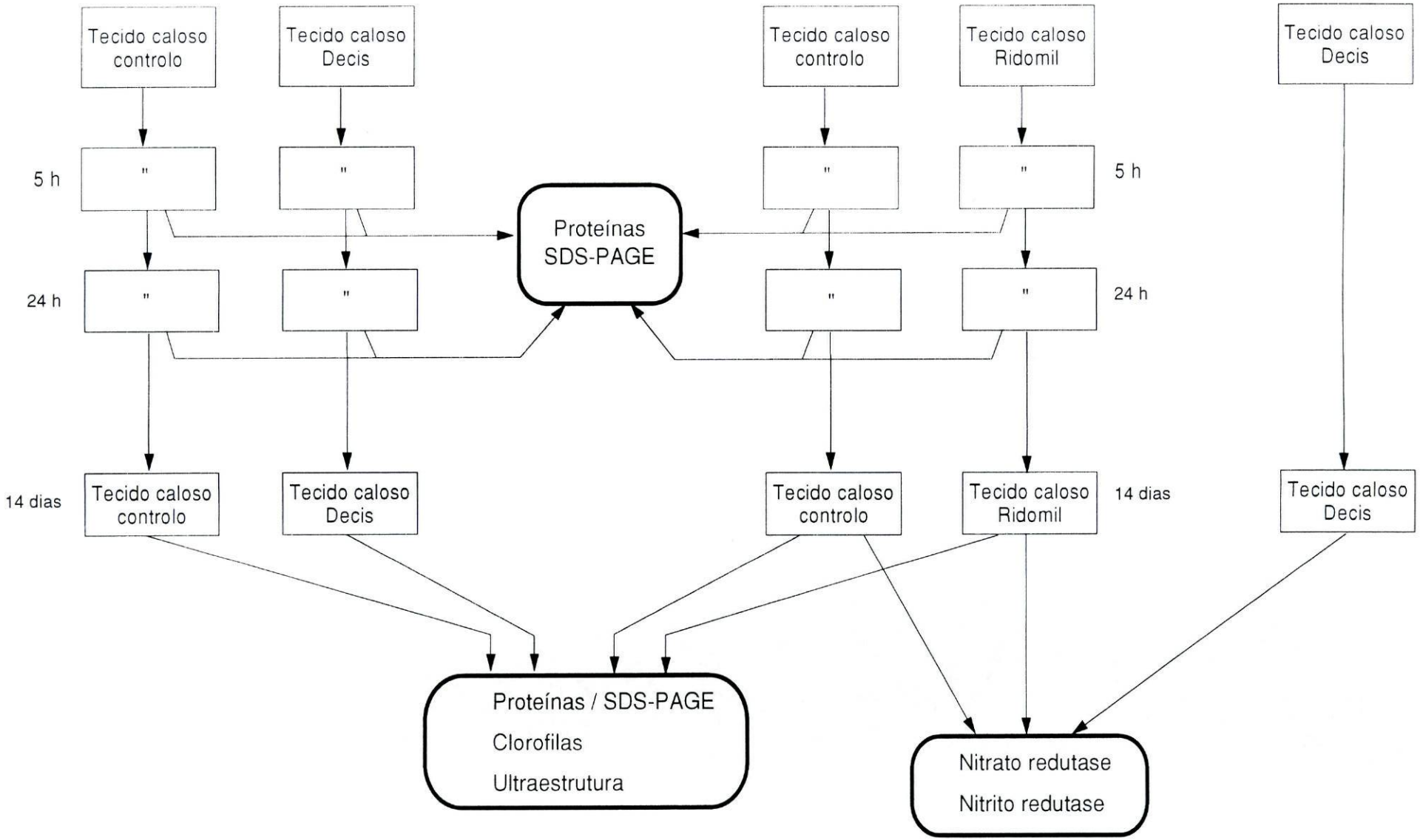
Os agroquímicos (Decis® e Ridomil® MZ 72) foram adicionados por filtração, aos meios de cultura previamente esterilizados, utilizando dispositivos Swinex com membrana Millipore 0,45 μm e em condições assépticas.

Nos estudos referidos nesta componente do trabalho, que implicaram a cultura de tecido caloso de batateira na presença de Decis® ou Ridomil® MZ 72, utilizou-se 4 g de inóculo e 30 cm^3 de meio nutritivo por placa de petri. De cada meio foram preparadas doze placas, das quais foram selecionadas cinco por tratamento para colheita de tecido caloso que foi usado para estudo ultraestrutural e bioquímico. As experiências foram realizadas duas vezes.

2.10. Estudos em tecido caloso

O Diagrama 2 procura mostrar o delineamento experimental seguido para estudar o efeito dos produtos fitofarmacêuticos em tecido caloso clorofilino derivado de folhas de *S. tuberosum*, quando crescido na presença destes produtos. Após 5 h e 24 h de crescimento, porções de tecido das três situações em estudo foram utilizadas para análise quantitativa das proteínas solúveis e insolúveis e apreciação do seu padrão electroforético em SDS-PAGE; após 14 dias de crescimento, para além do estudo destes parâmetros, foi também realizada a quantificação das clorofilas, determinação da actividade das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase e estudo ultraestrutural (consultar Diagrama 2).

DIAGRAMA 2


Tecido caloso controlo
Tecido caloso Decis
Tecido caloso controlo
Tecido caloso Ridomil
Tecido caloso Decis
5 h
"
"
"
"
5 h
Proteínas SDS-PAGE
24 h
"
"
"
"
24 h
14 dias
Tecido caloso controlo
Tecido caloso Decis
Tecido caloso controlo
Tecido caloso Ridomil
14 dias
Tecido caloso Decis
Proteínas / SDS-PAGE
Clorofilas
Ultraestrutura
Nitrato redutase
Nitrito redutase

Determinações bioquímicas

- Proteínas

Para a extracção e quantificação das proteínas totais (solúveis e insolúveis), amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, contendo PMSF 1 mM, leupeptina 10 µM e PVP 1% (p/v). Após centrifugação a 3000 x g, durante 15 min, o sobrenadante obtido foi usado para a quantificação das proteínas solúveis de acordo com Bradford (1976)[25]. O sedimento obtido foi ressuspenso no mesmo meio de extracção ao qual se adicionou SDS 2,5% (p/v); a suspensão resultante foi incubada durante 3 h a 4°C, seguido de 1 h à temperatura ambiente. Após centrifugação da suspensão a 3000 x g durante 15 min, as proteínas insolúveis foram quantificadas pelo método de Peterson (1977)[26].

- Clorofilas

As clorofilas foram extraídas e quantificadas de acordo com o método de Hodgins & van Huystee (1986), conforme referido na página 63.

- Nitrato redutase (NR; EC 1.6.6.1)

Preparação do extracto enzimático

Amostras de tecido caloso foram homogeneizadas a 4°C em almofariz contendo areia de quartzo, tendo sido utilizado o meio de homogeneização, modificado de Long & Oaks (1990), com a seguinte composição: tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,5, contendo Na_2-EDTA 1mM, FAD[27] 20 µM, BSA 1% (p/v), DTT 1 mM, cisteína 10 mM, leupeptina 10 µM, PMSF 1 mM e PVP 1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 45000 x g durante 30 min, a 4°C.

Actividade da NR

A actividade enzimática da NR foi ensaiada de acordo com King *et al.* (1992).

---

[25]Os reagentes e procedimento utilizados no método de Bradford (1976), foram anteriormente referidos na página 65.
[26]Os reagentes e procedimento utilizados no método de Peterson (1977), foram anteriormente referidos na página 65.
[27]FAD - Flavina adenina dinucleótido

A mistura de reacção continha 200 µL do extracto enzimático, tampão Hepes 0,1 M pH 7,0, FAD 0,022 µM, nitrato de potássio 15,4 mM e água desionizada, num volume final de 1,3 cm^3; a reacção enzimática foi iniciada pela adição de 100 µL de NADH (3,6 mg/cm^3 em tampão fosfato de potássio 0,04 M, pH 7,0). O branco foi preparado com todos os reagentes da mistura, substituindo-se o extracto enzimático por água desionizada. Depois de 20 min de incubação a 28°C, a reacção foi terminada pela fervura durante 10 min; os tubos foram arrefecidos para 28°C, após o que se adicionou 100 µL de ácido pirúvico (5,3 mg/cm^3) e 2 µL de desidrogenase do lactato (5000 U/0,5 cm^3), para oxidação do NADH residual. Após incubação a 28°C durante 10 min, a quantificação dos nitritos nas amostras foi feita pela adição de 250 µL de NPTL 0,08% (p/v) e 500 µL de SFA 2% (p/v em HCl 5 M). Decorridos 30 min à temperatura ambiente a absorvância foi lida a 540 nm.

Para a construção da recta padrão usou-se nitrito de sódio.

- Nitrito redutase (NR; EC 1.7.7.1)

A actividade da NiR foi determinada de acordo com o método de Vega *et al.* (1980), conforme anteriormente referido na página 66.

Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A separação das proteínas solúveis e insolúveis utilizando a técnica de SDS-PAGE, foi realizada de acordo com o procedimento descrito na página 69.

Microscopia electrónica de transmissão

O procedimento na preparação do material para observação a nível ultraestrutural, foi semelhante ao referido para o material foliar, conforme descrito na página 70.

2.11. Análise estatística

Para a comparação das médias dos dados experimentais obtidos nas determinações bioquímicas (folhas, tubérculos e tecido caloso), foi usado o teste *t* de "Student", com um nível de significância de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Estudos em folhas

Desenvolvimento das plantas

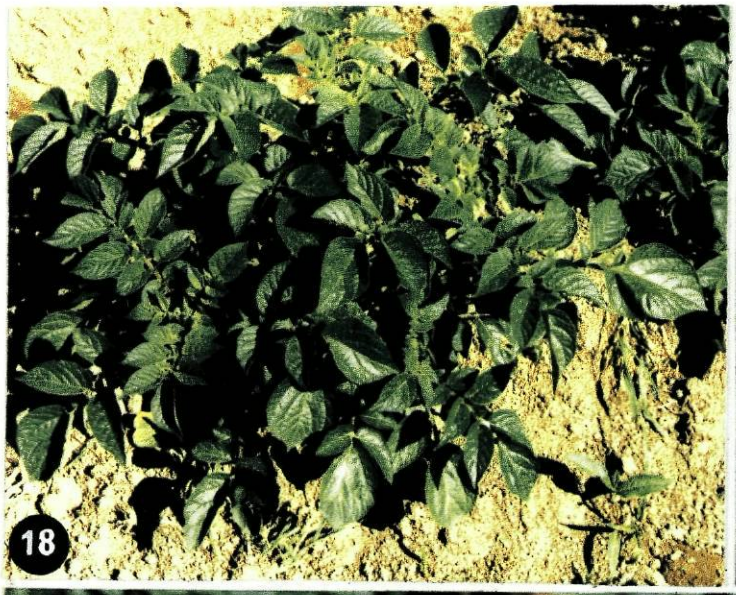
A observação regular semanal das plantas cultivadas no campo permitiu verificar que o seu crescimento decorreu normalmente, independentemente dos tratamentos efectuados com os agroquímicos utilizados (Figs. 18, 19, 20 e 21). Há, no entanto, que referir algumas diferenças manifestadas pelas plantas. De facto, a partir da 6ª semana de idade (cerca de 42-45 dae), embora a morfologia geral não surgisse alterada, começou a ser notório que cada grupo de plantas manifestava diferentes graus de senescência.

Em geral, as plantas tratadas com o insecticida Decis[1] apresentavam o ciclo de vida prolongado quando comparado com o da plantas controlo. O atraso da senescência era evidenciado pela cor mais verde das folhas tratadas, assim como pela capacidade destas plantas produzirem flores, durante um período de tempo mais longo do que as plantas não tratadas. As diferenças no grau de senescência entre as plantas controlo e

[1]Os agroquímicos utilizados com as designações comerciais de Decis®, Ridomil® MZ 72 e Shell Mancozebe® 80, vão passar a ser referidos neste capítulo e posteriores como Decis, Ridomil e Mancozebe.

Figs. 18 a 21 - Imagens de várias fases do ciclo de vida das plantas de batateira crescidas no campo (cv. Désirée). Fig. 18 - 17 dae; Fig. 19 - 39 dae; Fig. 20 - 50 dae; Fig. 21 - 69 dae.

Fig. 22 - 5ª folha de plantas controlo (1), tratadas com Decis (2), Ridomil (3) ou Mancozebe (4) (67 dae). A folha das plantas pulverizadas com Decis distingue-se nitidamente das restantes três folhas, devido ao menor grau de senescência que apresenta.



18



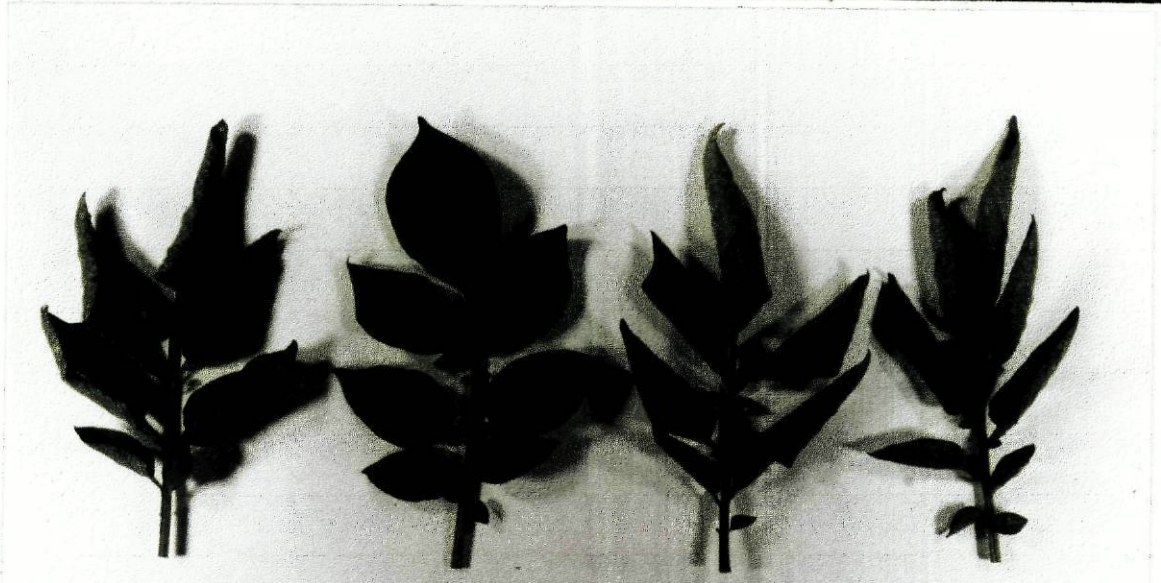
19



20



21



1 2 3 4

22

as pulverizadas com Decis eram facilmente detectadas aos 55 dias após a emergência (dae). De facto, era possível distinguir, macroscopicamente, nas folhas mais velhas das plantas controlo o desenvolvimento de áreas de clorose e necrose e, simultaneamente, era evidente a condição senescente das flores, enquanto que as plantas tratadas com Decis apresentavam sintomas de senescência menos pronunciados e algumas delas ainda possuíam flores não senescentes. Ao contrário, nas plantas tratadas com os fungicidas Ridomil ou Mancozebe eram perceptíveis sintomas de senescência foliar que se observavam um pouco mais precocemente do que nas plantas testemunho. Aos 67 dae, quer as plantas controlo, quer as tratadas com os fungicidas, mostravam na generalidade sintomas de senescência mais acentuados do que as plantas tratadas com Decis. A Fig. 22 mostra a 5ª folha dos quatro grupos de plantas, sendo vísivel qua as folhas provenientes das plantas controlo e tratadas com os fungicidas se apresentavam mais cloróticas e com as margens mais enroladas do que a folha correspondente das plantas pulverizadas com Decis, a qual se destacava nitidamente das restantes folhas. Nos quatro grupos de plantas, os sintomas de senescência generalizavam-se a um maior número de folhas à medida que aumentava a idade das plantas.

Determinações bioquímicas

- Clorofilas

Os níveis das clorofilas (a+b) aos 41 dae eram superiores aos valores encontrados aos 24 dae (após 1º tratamento), quer nas plantas controlo, quer nas tratadas com Decis, verificando-se que decresciam posteriormente (Tabela 1 e Gráf. 1). Nas plantas não tratadas este decréscimo foi sempre significativo (cerca de 12% aos 55 dae e 26% aos 67 dae), enquanto que nas plantas pulverizadas com o insecticida o teor clorofilino surgia diminuído (cerca de 28%) apenas aos 67 dae, relativamente ao valor quantificado aos 55 dae (3º tratamento). Nas plantas tratadas com os fungicidas verificou-se um decréscimo gradual das clorofilas ao longo do tempo (Tabela 1 e Gráf. 1).

Tabela 1 - Níveis de clorofilas em plantas controlo e tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe.

	Clorofilas a+b (µmol/gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$2,959 \pm 0,014^{a}$	$3,039 \pm 0,086^{a}$	$2,918 \pm 0,022^{a}$	$2,974 \pm 0,029^{a}$
41 dae	$3,477 \pm 0,017^{b}$	$3,623 \pm 0,089^{b}$	$2,742 \pm 0,041^{*b}$	$2,494 \pm 0,022^{*b}$
55 dae	$3,045 \pm 0,079^{c}$	$3,388 \pm 0,076^{*b}$	$2,395 \pm 0,026^{*c}$	$1,782 \pm 0,143^{*c}$
67 dae	$2,257 \pm 0,073^{d}$	$2,437 \pm 0,081^{c}$	$1,532 \pm 0,066^{*d}$	$1,698 \pm 0,078^{*c}$

Valores expressos como médias ± E.P.[2] (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

No caso das plantas tratadas com Ridomil essas diminuições foram sempre significativas e, no que se refere às plantas pulverizadas com Mancozebe, a variação observada de cerca de 16% aos 41 dae e que aumentou para 29% aos 55 dae deixou posteriormente de ter significado, já que aos 67 dae o teor clorofilino era semelhante ao da colheita anterior (Tabela 1 e Gráf. 1).

Comparando o teor em clorofilas de cada grupo de plantas tratadas com a situação controlo, verificou-se que o 1º tratamento (24 dae) com os agroquímicos não produzia qualquer efeito, em qualquer dos grupos de plantas (Tabela 1 e Gráf. 1); no entanto, após a 2ª aplicação (41 dae) as folhas tratadas com Ridomil ou Mancozebe tinham um teor em clorofilas inferior ao do das plantas controlo (cerca de 21% e 28% para as plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe, respectivamente).

No material foliar colhido aos 55 dae surgia um aumento de cerca de 11% nas plantas tratadas com Decis, diferença que desaparece aos 67 dae (Tabela 1 e Gráf. 1). Contrariamente, as aplicações dos fungicidas às plantas continuaram a afectar negativamente o teor clorofilino, uma vez que o comportamento observado aos 55 dae

[2] E.P. - Erro Padrão

e 67 dae era semelhante ao registado após o 2º tratamento, ou seja, a quantidade de clorofilas era sempre menor do que nas plantas testemunho, como se pode observar na Tabela 1 e Gráfico 1.

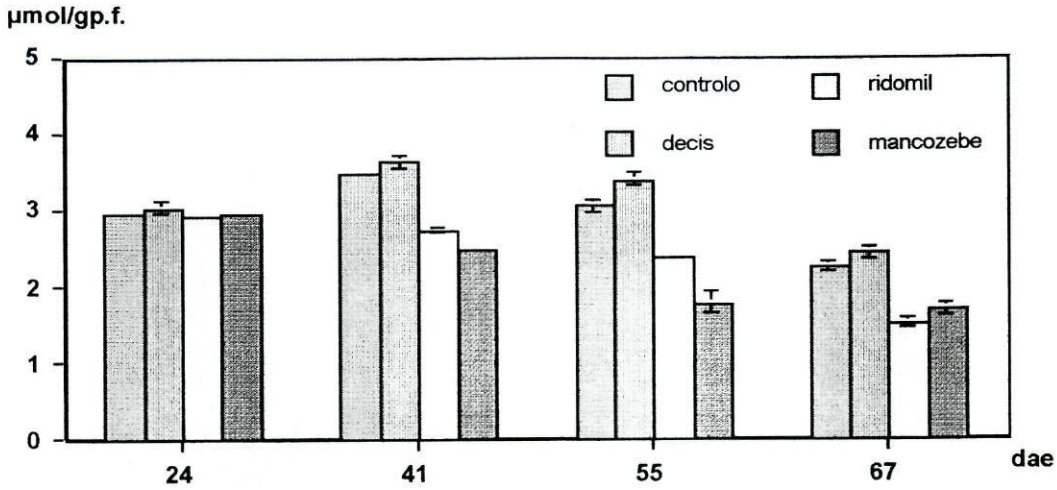


Gráfico 1 - Alterações na quantidade de clorofilas a+b nas plantas controlo e nas tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe. Valores expressos como médias ± E.P.

- Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo; EC 4.1.1.39)

A actividade da RuBisCo, a enzima chave da fotossíntese, diminuiu nos grupos de plantas controlo e tratadas com os fungicidas ao longo do período experimental. Nas plantas controlo verificou-se ocorrer uma diminuição de cerca de 14% aos 55 dae, comparativamente ao valor quantificado aos 41 dae, diferença que se acentuou posteriormente (aos 67 dae) para 53%. Os valores de actividade da RuBisCo encontrados nas folhas das plantas pulverizadas com os fungicidas, ao longo dos tratamentos, mostraram que inicialmente as variações não eram significativas, contudo, nas folhas colhidas aos 67 dae a actividade enzimática surgiu afectada negativamente, com decréscimos de 37% para as plantas tratadas com Ridomil e 43% para as pulverizadas com Mancozebe, relativamente à quantificação anterior (Tabela 2 e Gráf. 2).

Tabela 2 - Actividade da RuBisCo em plantas controlo e tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe.

	RuBisCo (nkat NADH oxid./gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	50,89 ± 1,56^{a}	50,72 ± 3,50^{a}	33,56 ± 0,31^{*a}	36,90 ± 2,13^{*a}
41 dae	47,47 ± 1,75^{a}	49,63 ± 1,57^{a}	31,74 ± 2,30^{*a}	33,20 ± 1,39^{*a}
55 dae	40,89 ± 1,65^{b}	51,29 ± 2,07^{*a}	27,92 ± 1,36^{*a}	29,22 ± 1,60^{*a}
67 dae	19,37 ± 1,06^{c}	34,96 ± 0,39^{*b}	17,71 ± 2,26^{b}	16,55 ± 1,43^{b}

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

Comportamento diferente foi o verificado para as plantas tratadas com Decis (Tabela 2 e Gráf. 2). Neste caso, ao longo do período experimental, houve uma certa estabilidade nos valores da actividade enzimática, registando-se apenas uma diminuição acentuada de cerca de 32% no material colhido aos 67 dae em relação à quantificação anterior (55 dae), portanto, numa fase em que as plantas apresentavam já sintomas de senescência. Apesar deste decréscimo, os valores de actividade da RuBisCo neste grupo de plantas, continuavam a ser os mais elevados dos quatro conjuntos de plantas (Tabela 2 e Gráf. 2).

Ao compararmos os valores encontrados nas plantas nas diferentes situações (Tabela 2 e Gráf. 2) verifica-se que os tratamentos com Decis não afectaram a actividade da RuBisCo, dado que após os dois primeiros tratamentos (24 e 41 dae), os valores encontrados são idênticos aos do controlo. Depois da 3ª aplicação (55 dae) a actividade enzimática surgia aumentada 25%, atingindo cerca de mais 81% do que as plantas controlo na última determinação (67 dae).

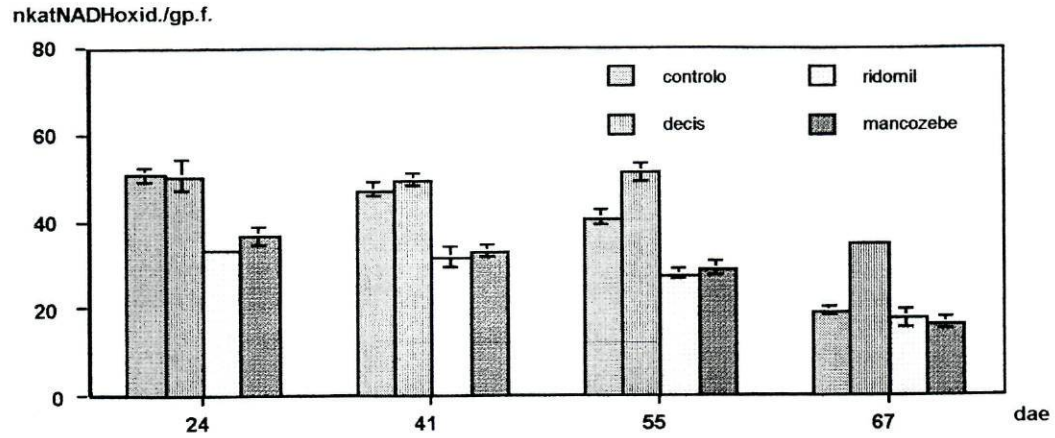


Gráfico 2 - Variação da actividade da enzima ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo), ao longo do período experimental, expressa em nkat NADH oxid./gp.f. nos quatro grupos de plantas. Valores expressos como médias ± E.P.

O tratamento com os fungicidas provocava comportamento contrário, ou seja, a actividade da RuBisCo surgia sempre diminuída e, como se pode observar no Gráfico 2, estes dois grupos de plantas apresentavam um padrão de variação muito semelhante em relação à situação testemunho. As diferenças encontradas após cada aplicação dos fungicidas, deixaram de ter significado aos 67 dae, tendo sido quantificados valores idênticos nos três grupos de plantas (Tabela 2 e Gráf. 2).

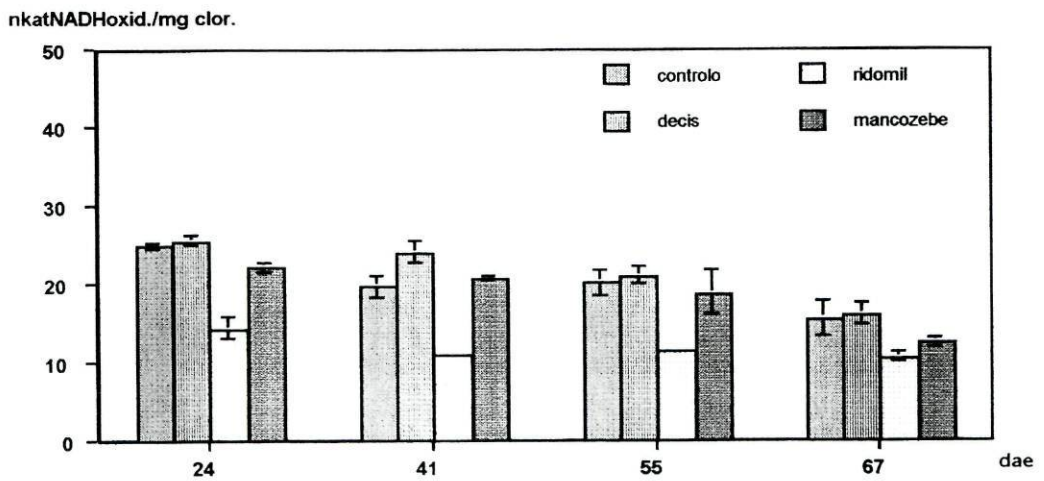


Gráfico 3 - Actividade da RuBisCo expressa em nkat NADH oxid./mg clorofilas. Como se pode verificar os valores de actividade mais elevados foram os obtidos as folhas das plantas tratadas com Decis. Valores expressos como médias ± E.P.

Tabela 3 - Valores da actividade da RuBisCo em folhas dos quatro grupos de plantas.

	RuBisCo (nkat NADH oxid./mg clorofilas)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$24,91 \pm 0,44^{a}$	$25,56 \pm 0,61^{a}$	$14,32 \pm 1,40^{*a}$	$22,14 \pm 0,72^{*a}$
41 dae	$19,67 \pm 1,34^{b}$	$24,08 \pm 1,36^{a}$	$10,99 \pm 0,05^{*a}$	$20,78 \pm 0,32^{a}$
55 dae	$20,13 \pm 1,70^{b}$	$21,12 \pm 1,08^{a}$	$11,60 \pm 0,20^{*a}$	$18,86 \pm 2,77^{a}$
67 dae	$15,43 \pm 2,23^{b}$	$16,09 \pm 1,35^{b}$	$10,56 \pm 0,68^{a}$	$12,39 \pm 0,60^{b}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

Tendo presente que o teor clorofilino surgia alterado nos grupos das plantas tratadas após o 2º e 3º tratamentos (41 e 55 dae, respectivamente) e na última colheita de material (67 dae) e, atendendo à estreita relação funcional entre este parâmetro bioquímico e a actividade da RuBisCo, procurou-se verificar se surgiam alterações no padrão de variação da enzima quando era expressa por mg de clorofilas a+b (Tabela 3 e Gráf. 3).

Verficou-se que deixavam de ter significado as diferenças encontradas entre as plantas controlo e as tratadas com Decis, enquanto que nas tratadas com Ridomil a actividade enzimática surgia, do mesmo modo, afectada negativamente após cada um dos tratamentos. Após o 1º tratamento com Mancozebe a actividade da RuBisCo continuava a manter-se inferior à das plantas controlo, mas, depois do 2º e 3º tratamentos, não eram detectadas variações significativas entre os dois grupos de plantas, como se pode verificar por comparação das Tabelas 2 e 3 e dos Gráficos 2 e 3.

- Proteínas

O teor em proteínas solúveis diminuiu em todos os grupos de plantas ao longo do período experimental (Tabela 4 e Gráf. 4). Entre os 24 e 41 dae não ocorria variação significativa, enquanto que ocorria uma diminuição muito acentuada aos 55 dae, relativamente aos valores quantificados aos 41 dae, decréscimos de cerca de 18% para as plantas controlo, 25% para as plantas tratadas com Decis, 12% para as tratadas com Ridomil e 14% para as tratadas com Mancozebe. Na última colheita de material foliar (67 dae) o teor de proteínas solúveis nas plantas controlo e pulverizadas com Decis era semelhante aos níveis encontrados aos 55 dae, enquanto que nos grupos de plantas tratadas com os fungicidas era inferior (Tabela 4 e Gráf. 4).

A análise dos resultados presentes na Tabela 4 mostra que o insecticida Decis provocava aumento do teor de proteínas solúveis apenas após a 1ª e 2ª aplicações (24 e 41 dae), de cerca de 11% e 12%, respectivamente (Tabela 4 e Gráf. 4); após o último tratamento (55 dae), e no material colhido aos 67 dae, não ocorriam diferenças significativas relativamente às plantas controlo.

Tabela 4 - Teor de proteínas solúveis em plantas controlo e tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe.

	Proteínas Solúveis (mg/gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$88,80 \pm 0,11^{a}$	$98,12 \pm 1,80^{*a}$	$91,01 \pm 1,47^{a}$	$89,38 \pm 2,54^{a}$
41 dae	$86,46 \pm 0,61^{a}$	$96,42 \pm 0,16^{*a}$	$89,68 \pm 2,04^{a}$	$89,20 \pm 2,66^{a}$
55 dae	$70,92 \pm 0,22^{b}$	$71,87 \pm 2,30^{b}$	$79,11 \pm 1,21^{*b}$	$77,06 \pm 0,06^{*b}$
67 dae	$70,18 \pm 3,32^{b}$	$71,92 \pm 2,34^{b}$	$65,67 \pm 1,26^{c}$	$63,57 \pm 0,36^{c}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=5). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo ($P<0,05$).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior ($P<0,05$).

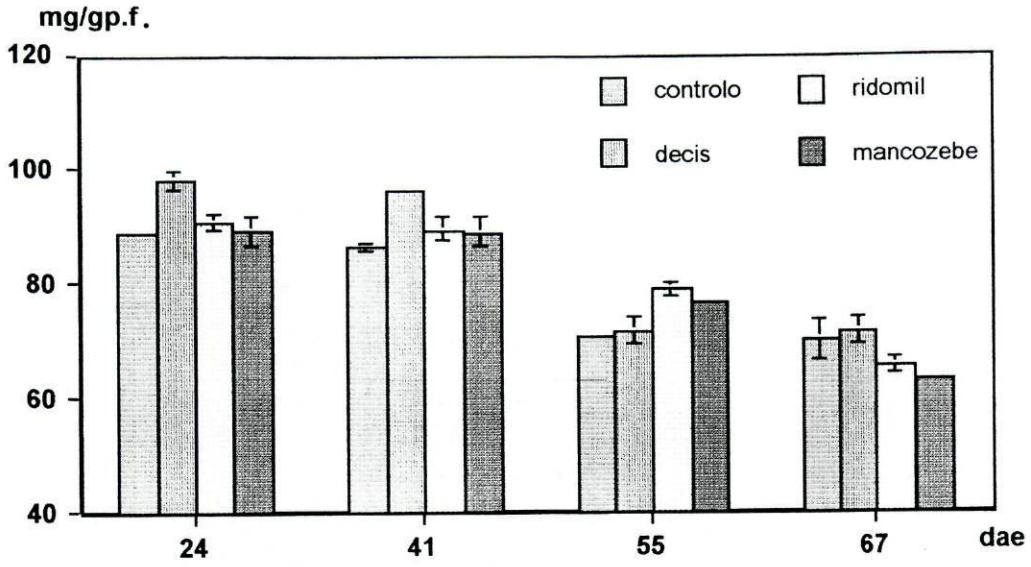


Gráfico 4 - Proteínas solúveis, expressas em mg/g peso fresco, nas plantas controlo, tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe. Valores expressos como médias ± E.P.

Nas plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe, após os dois primeiros tratamentos (24 e 41 dae), os níveis de proteínas eram semelhantes aos das plantas testemunho, ocorrendo, contudo, um aumento desses valores em ambos os grupos de plantas depois da 3ª aplicação dos agroquímicos (55 dae), diferenças que desapareceram posteriormente (67 dae) (Tabela 4 e Gráf. 4).

A quantidade de proteínas insolúveis não sofria flutuações ao longo do período experimental em nenhum dos grupos de plantas, com excepção das plantas tratadas com Ridomil, nas quais ocorria um aumento significativo após o 2º tratamento (41 dae) de cerca de 15% relativamente ao valor do 1º tratamento (24 dae), diferença que desapareceu posteriormente (Tabela 5 e Gráf. 5).

Ao contrário do verificado para as proteínas solúveis, não se encontraram diferenças no teor das proteínas insolúveis entre o material foliar tratado com cada um dos produtos fitofarmacêuticos e o material controlo, comportamento que se repetiu em todas as colheitas efectuadas (Tabela 5 e Gráf. 5).

Tabela 5 - Quantidade de proteínas insolúveis nas plantas controlo e tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe.

	Proteínas Insolúveis (mg/gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	24,02 ± 0,70^a	24,76 ± 0,97^a	22,63 ± 0,25^a	22,49 ± 0,63^a
41 dae	25,76 ± 0,39^a	25,77 ± 0,47^a	26,02 ± 0,50^b	24,82 ± 0,98^a
55 dae	24,15 ± 1,22^a	25,36 ± 1,17^a	24,97 ± 0,94^b	24,71 ± 1,51^a
67 dae	23,61 ± 0,37^a	23,79 ± 0,77^a	22,81 ± 0,78^b	21,30 ± 1,08^a

Valores expressos como médias ± E.P. (n=5).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

Analisando os valores para as proteínas totais (solúveis + insolúveis), observa-se que na generalidade, o padrão de variação era semelhante ao que foi descrito para as solúveis, ou seja, as diferenças encontradas foram devidas, essencialmente, aos diferentes níveis de proteínas solúveis quantificados nos quatro grupos de plantas, ao longo do período experimental (Tabela 6).

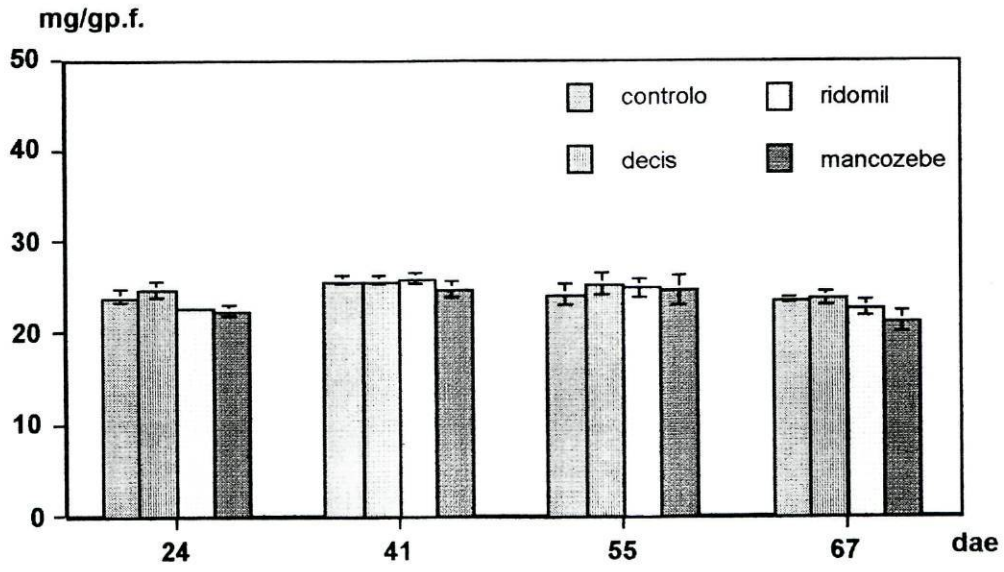


Gráfico 5 - Proteínas insolúveis quantificadas nos quatro grupos de plantas ao longo do tempo. Valores expressos como médias ± E.P.

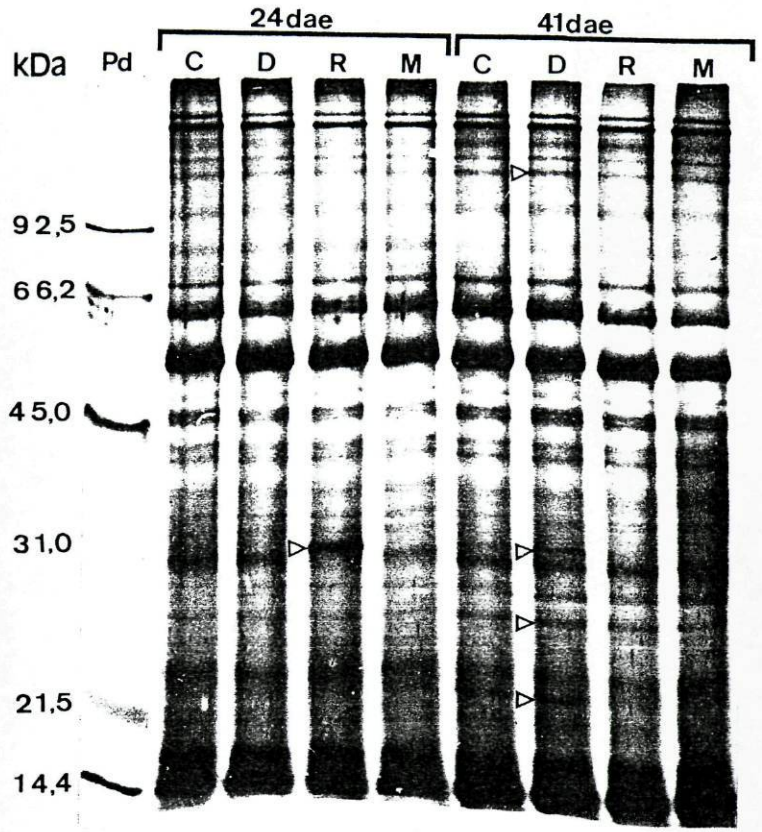
Tabela 6 - Proteínas totais em plantas controlo e tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe.

	Proteínas Totais (mg/gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$112,82 \pm 0,60^{a}$	$122,88 \pm 2,77^{*a}$	$113,64 \pm 1,29^{a}$	$111,87 \pm 3,04^{a}$
41 dae	$112,22 \pm 0,53^{a}$	$122,19 \pm 0,32^{*a}$	$115,70 \pm 2,51^{a}$	$114,02 \pm 5,64^{a}$
55 dae	$95,07 \pm 3,66^{b}$	$97,23 \pm 1,13^{b}$	$104,08 \pm 1,32^{*b}$	$101,77 \pm 1,57^{*b}$
67 dae	$93,79 \pm 3,66^{b}$	$95,71 \pm 1,57^{b}$	$88,48 \pm 0,96^{c}$	$84,87 \pm 1,43^{c}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=5). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo ($P<0,05$).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior ($P<0,05$).

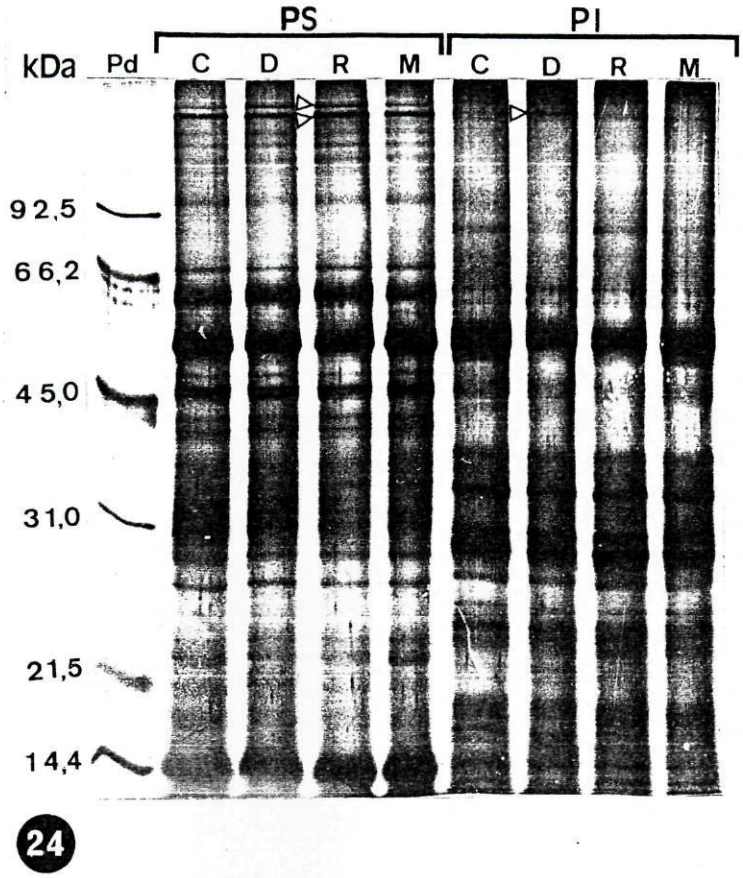
Para além da quantificação bioquímica, estudou-se também o padrão electroforético das proteínas solúveis e insolúveis em SDS-PAGE. Apesar de surgirem algumas diferenças nos níveis das proteínas solúveis entre as plantas controlo e as tratadas, os padrões electroforéticos em SDS-PAGE não mostraram a existência de novas bandas polipeptídicas, portanto, só surgiram diferenças quantitativas.

No gel das proteínas solúveis do material foliar dos 24 dae, verificou-se que na coluna das proteínas do material tratado com Ridomil, apenas uma banda polipeptídica com massa molecular de cerca de 32 kDa aparecia mais intensamente corada (Fig. 23 - 24 dae, coluna R). O gel das proteínas solúveis, quer do material foliar tratado com Decis (Fig. 23 - 24 dae, coluna D), quer do tratado com Mancozebe (Fig. 23 - 24 dae, coluna M), mostravam um padrão semelhante de polipeptídeos ao do material controlo (Fig. 23 - 24 dae, coluna C). Os padrões electroforéticos das proteínas insolúveis, das quatro situações estudadas não evidenciavam diferenças notórias.



23

Fig. 23 - SDS-PAGE. No gel das proteínas solúveis, quer aos 24 dae, quer aos 41 dae, algumas bandas de polipeptídeos aparecem mais intensamente coradas (assinaladas com ▷) em comparação com a situação controlo (coluna C, 24 e 41 dae, respectivamente). Colunas D, R e M - material tratado com Decis, Ridomil ou Mancozebe, respectivamente; Pd - padrões proteicos.



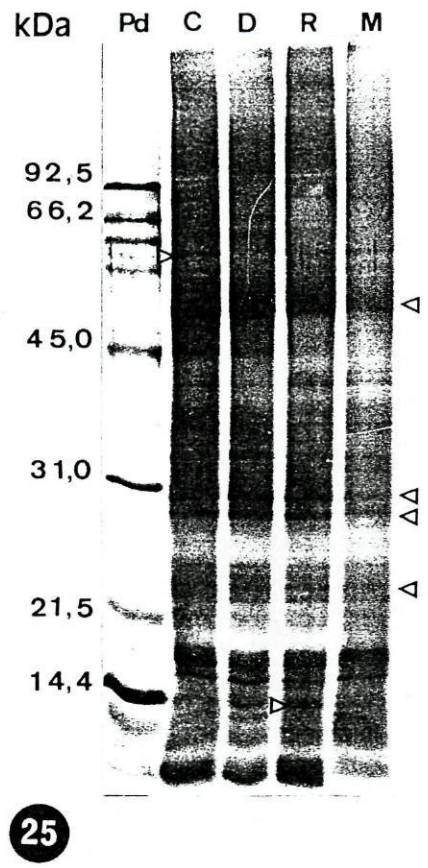


Fig. 24 - SDS-PAGE das proteínas solúveis (PS) e insolúveis (PI) aos 55 dae. No gel das proteínas solúveis apenas duas bandas aparecem mais intensamente coradas (assinaladas com ▷) no material tratado com Ridomil (coluna R), enquanto que no gel das insolúveis, é na coluna correspondente ao material tratado com Decis (coluna D) que uma banda surge mais corada que a correspondente no controlo (coluna C). Coluna M - material tratado com Mancozebe; Pd - padrões proteicos.

Fig. 25 - Padrão electroforético em SDS-PAGE das proteínas insolúveis, do material foliar aos 67 dae. Note-se a menor intensidade de coloração de algumas bandas polipeptídicas (assinaladas com ▷) na coluna do material tratado com Mancozebe (coluna M). Coluna C - controlo; colunas D e R - material tratado com Decis, ou Ridomil, respectivamente; Pd - padrões proteicos.

A análise do padrão electroforético das proteínas solúveis do material foliar aos 41 dae (após 2º aplicação), mostrou que, do mesmo modo ao observado aos 24 dae, surgiram diferenças no grau de coloração de algumas bandas polipeptídicas (Fig. 23). Essas diferenças eram neste caso mais facilmente detectadas na coluna do material tratado com Decis, onde pelo menos quatro bandas polipeptídicas apareciam mais intensamente coradas, com massas moleculares de cerca de 120, 34, 27 e 23 kDa, respectivamente (Fig. 23 - 41 dae, coluna D). No gel das proteínas insolúveis os quatro grupos de plantas apresentavam padrões semelhantes de bandas polipeptídicas.

Depois do último tratamento com os agroquímicos, verificou-se novamente que no gel das proteínas solúveis apareciam duas bandas mais intensamente coradas na coluna correspondente ao material foliar tratado com Ridomil (Fig. 24 - PS, coluna R); essas bandas tinham massas moleculares de cerca de 154 e 149 kDa. No que se refere ao gel das proteínas insolúveis, na coluna correspondente ao material pulverizado com Decis (Fig. 24 - PI, coluna D), somente uma banda surgiu com uma diferente intensidade de coloração, com massa molecular aproximada de 149 kDa.

Os geles das proteínas solúveis aos 67 dae não mostravam diferenças entre as quatro situações estudadas; no entanto, relativamente às proteínas insolúveis foi possível verificar que na coluna do material controlo uma das bandas de polipeptídeos (com massa molecular de 60 kDa), devido ao mais acentuado grau de coloração que apresentava, distinguia-se facilmente da correspondente nas colunas do material tratado (Fig. 25 - comparar coluna C com colunas D, R e M). No mesmo gel observou-se que na coluna R uma banda com massa molecular aproximada de 14 kDa aparecia muito corada e, ao contrário, na coluna M várias bandas (com massas moleculares de cerca de 55, 30, 29 e 25 kDa), surgiram com uma menor intensidade de coloração que as correspondentes no material controlo (Fig. 25 - coluna C).

- Nitrato Redutase (NR; EC 1.6.6.1)

A actividade da nitrato redutase, cujos valores estão reunidos na Tabela 7, apresentava um padrão de variação semelhante ao longo do período experimental, em todos os

grupos de plantas. Em todos ocorreu uma diminuição de actividade aos 41 dae relativamente aos valores quantificados na colheita anterior, decréscimo da ordem dos 40%, 52%, 48% e 58%, para as plantas controlo, tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe, respectivamente (Tabela 7 e Gráf. 6). A actividade da NR surgia semelhante no material foliar colhido subsequentemente (aos 55 e 67 dae), com excepção das plantas tratadas com Mancozebe, nas quais a actividade surgiu diminuída cerca de 40% na última colheita, relativamente ao valor dos 55 dae (Tabela 7 e Gráf. 6).

Tabela 7 - Valores encontrados para a actividade da NR nos quatro grupos de plantas estudados.

	NR (nkat NO_2^-/gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	2,298 ± 0,160^{a}	3,001 ± 0,070^{*a}	2,367 ± 0,130^{a}	2,370 ± 0,250^{a}
41 dae	1,388 ± 0,070^{b}	1,448 ± 0,150^{b}	1,230 ± 0,150^{b}	1,006 ± 0,020^{*b}
55 dae	1,353 ± 0,100^{b}	1,350 ± 0,003^{b}	0,941 ± 0,110^{*b}	0,860 ± 0,090^{*b}
67 dae	1,069± 0,070^{b}	1,576 ± 0,070^{*b}	0,874 ± 0,120^{b}	0,513 ± 0,001^{*c}

Valores expressos como médias ± E.P. (n=6). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

A análise da representação gráfica dos valores obtidos (Gráf. 6), mostra que, relativamente ao controlo, a actividade da NR surgiu mais elevada significativamente (aumento de cerca de 31%) no material tratado com Decis (24 dae) após o 1º tratamento; porém, esta diferença desapareceu após as duas aplicações subsequentes, voltando a registar-se aos 67 dae uma maior actividade do que no controlo (Tabela 7 e Gráf. 6).

Os fungicidas não provocavam inicialmente variações da actividade da NR (Tabela 7 e Gráf. 6); no entanto, depois do 3ª pulverização com Ridomil a actividade enzimática surgia diminuída cerca de 31%. Nas plantas tratadas com Mancozebe, verificou-se que

ocorreu uma diminuição sucessiva e gradual da actividade da NR; no material colhido aos 41 dae foi quantificada um decréscimo de 28%, aos 55 dae de 36% e, aos 67 dae, uma diminuição de cerca de 52%.

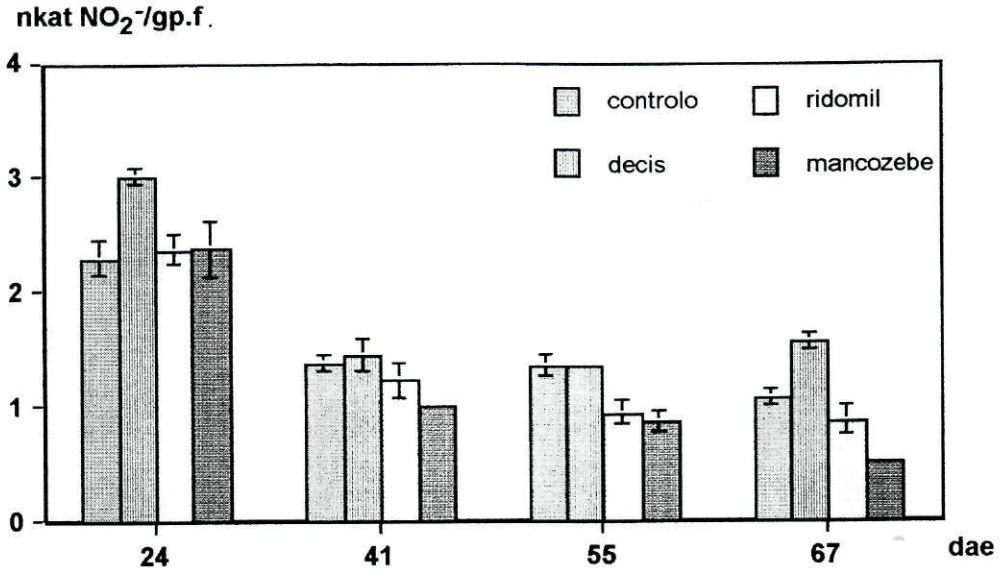


Gráfico 6 - Comportamento da enzima nitrato redutase nas folhas das plantas controlo e nas folhas das plantas tratadas. Valores expressos como médias ± E.P.

- Nitrito Redutase (NiR; EC 1.7.7.1)

Ao longo do tempo a actividade da nitrito redutase diminuiu progressivamente em todos os grupos de plantas (Tabela 8 e Gráf. 7). No material colhido aos 41 dae verificou-se que a sua actividade decrescia nos grupos de plantas controlo e tratadas com Decis, relativamente aos valores encontrados na colheita anterior (24 dae), não ocorrendo alterações significativas nos dois grupos de plantas tratadas com os fungicidas (Tabela 8 e Gráf. 7). Contudo, a actividade da NiR diminuiu acentuadamente aos 55 dae em todos os grupos de plantas em relação à colheita dos 41 dae (decréscimos de 23%, 24%, 27% e 15% nas plantas controlo, tratadas com Decis, Ridomil ou Mancozebe, respectivamente), continuando a surgir significativamente diminuída aos 67 dae, somente nas plantas tratadas com Mancozebe (Tabela 8 e Gráf. 7).

Tabela 8 - Actividade da NiR em plantas controlo e tratadas.

	NiR (nkat NO_2^- reduzido/gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$94,77 \pm 1,29^{a}$	$101,20 \pm 0,79^{*a}$	$89,52 \pm 0,86^{*a}$	$81,58 \pm 0,61^{*a}$
41 dae	$87,43 \pm 0,83^{b}$	$96,52 \pm 1,48^{*b}$	$87,79 \pm 2,58^{a}$	$76,41 \pm 2,02^{*a}$
55 dae	$67,92 \pm 3,01^{c}$	$73,60 \pm 0,94^{c}$	$63,82 \pm 0,95^{b}$	$65,24 \pm 1,96^{b}$
67 dae	$65,16 \pm 0,09^{c}$	$70,78 \pm 1,97^{*c}$	$57,67 \pm 4,76^{b}$	$50,38 \pm 1,43^{*c}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=6). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo ($P<0,05$).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior ($P<0,05$).

Na Tabela 8 pode ver-se que as plantas tratadas com Decis apresentavam sempre valores de actividade da NiR significativamente superiores aos das plantas controlo, com excepção do material colhido aos 55 dae, ou seja depois do 3º tratamento (Tabela 8 e Gráf. 7). A análise dos resultados nas plantas tratadas com os fungicidas mostraram que apenas ocorria diferença significativa na actividade da NiR entre as plantas pulverizadas com Ridomil e as controlo aos 24 dae; porém, em relação às plantas tratadas com Mancozebe, registaram-se decréscimos com diferenças de cerca de 14% após a 1ª aplicação e, de 13%, após o 2º tratamento (aos 24 e 41 dae, respectivamente). Do mesmo modo, aos 67 dae, a actividade nas plantas tratadas com o fungicida de contacto surgia significativamente diminuída relativamente ao controlo cerca de 23% (Tabela 8 e Gráf. 7).

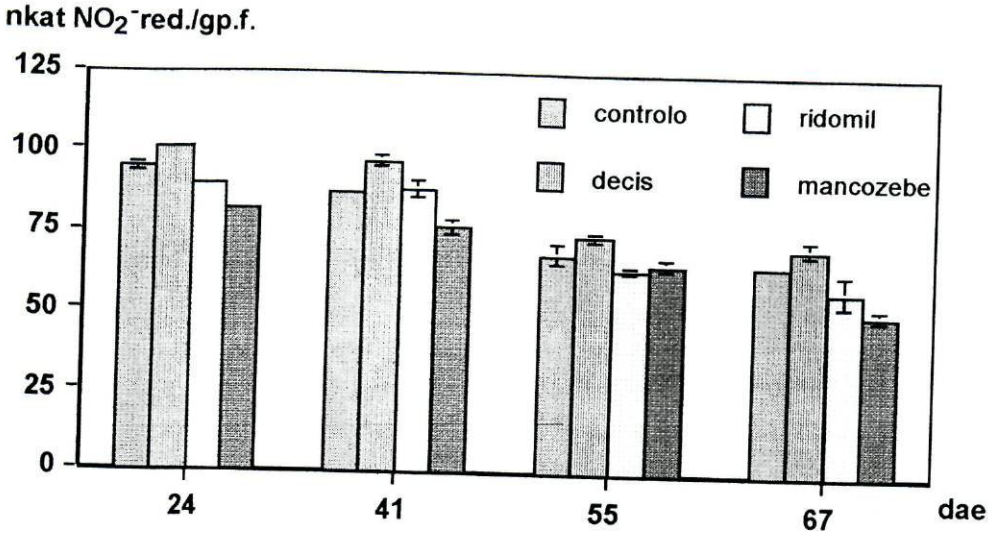


Gráfico 7 - Variação da actividade da nitrito redutase nas plantas controlo e nas plantas tratadas, ao longo do período experimental. Valores expressos como médias ± E.P.

Dado que a quantidade de proteínas solúveis variava em consequência dos tratamentos com os agroquímicos, procurou-se verificar se o padrão de comportamento da NiR surgia alterado, tomando como referência o teor de proteínas (mg proteína); o padrão de variação era muito semelhante ao encontrado quando a actividade enzimática era expressa por g de peso fresco.

- Ião Nitrato

A quantificação do ião nitrato acumulado nas folhas mostrou que ocorreu uma acentuada diminuição após o 2º tratamento (41 dae), em todos os grupos de plantas, relativamente aos valores dos 24 dae (Tabela 9 e Gráf. 8); os decréscimos foram de cerca de 40% nas plantas controlo, 67% nas plantas tratadas com Decis, 60% nas tratadas com Ridomil e 54% nas plantas pulverizadas com Mancozebe. Na colheita seguinte (55 dae), registaram-se novamente diminuições, mas menos acentuadas e, apenas nos dois primeiros grupos de plantas, ou seja, nas plantas controlo (16%) e nas tratadas com Decis (28%). Aos 67 dae nas plantas controlo manteve-se o nível deste ião, enquanto que nas plantas tratadas com Decis a quantidade de ião nitrato surgia aumentada. Ao contrário, nas plantas pulverizadas com Ridomil ou Mancozebe ocorria uma diminuição no teor de ião nitrato (Tabela 9 e Gráf. 8).

Tabela 9 - Teor de ião nitrato acumulado nas folhas das plantas controlo e tratadas com os agroquímicos.

	Ião Nitrato (mg/gp.s.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$10,16 \pm 0,64^{a}$	$27,21 \pm 1,79^{*a}$	$14,39 \pm 0,21^{*a}$	$11,9 \pm 1,10^{a}$
41 dae	$6,14 \pm 0,19^{b}$	$9,12 \pm 0,42^{*b}$	$5,79 \pm 0,33^{b}$	$5,45 \pm 0,64^{b}$
55 dae	$5,15 \pm 0,12^{c}$	$6,58 \pm 0,26^{*c}$	$5,89 \pm 0,46^{b}$	$5,48 \pm 0,20^{b}$
67 dae	$5,29 \pm 0,17^{c}$	$8,38 \pm 0,24^{*d}$	$4,59 \pm 0,14^{*c}$	$4,29 \pm 0,13^{*c}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo ($P<0,05$).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior ($P<0,05$).

No Gráfico 8 e Tabela 9 é possível constatar que os níveis do ião nitrato surgíam sempre significativamente aumentados nas plantas tratadas com Decis, sendo este aumento muito acentuado (cerca de 168%) após o 1º tratamento (24 dae). Esta diferença tornou-se progressivamente menor, sendo de cerca de 49% e de 28% após o 2º e 3º tratamentos. O tratamento com Ridomil provocava também um aumento da acumulação do ião nitrato (cerca de 42%) após o 1º tratamento (24 dae), aumento que desapareceu com os tratamentos subsequentes, detectando-se aos 67 dae, uma diminuição do nível de nitrato de cerca de 13% relativamente ao controlo. Nas plantas tratadas com Mancozebe o teor de ião nitrato não diferia acentuadamente do das plantas controlo ao longo do período experimental; no entanto, na última colheita de material foliar (67 dae), foi quantificada uma diminuição de 19% comparativamente ao controlo (Tabela 9 e Gráf. 8).

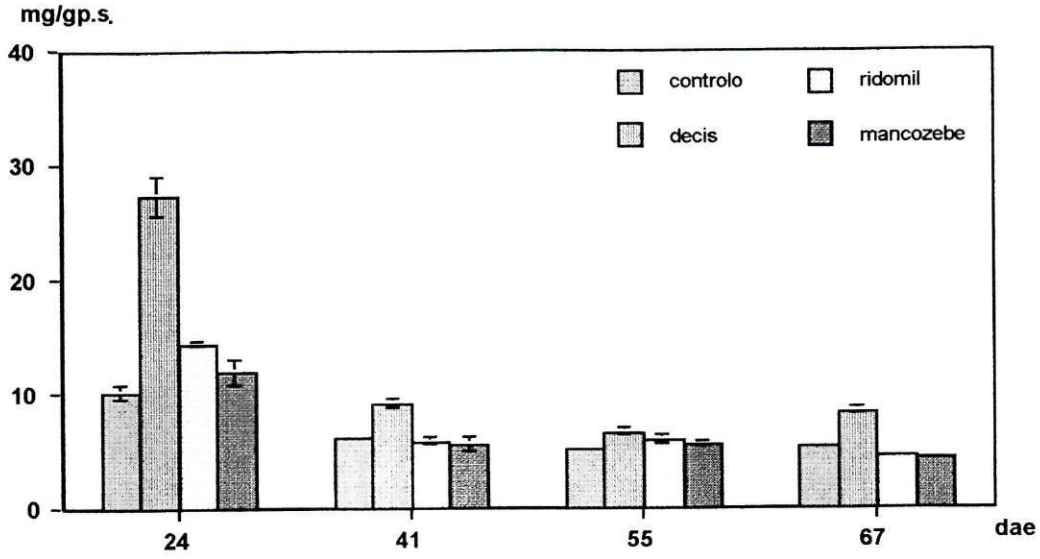


Gráfico 8 - Variação dos níveis de ião nitrato acumulado nas folhas das plantas controlo e das plantas tratadas, ao longo do período experimental. Valores expressos como médias ± E.P.

- Actividade Respiratória

A análise dos resultados obtidos, mostra que a actividade respiratória diminuiu ao longo do ciclo cultural de um modo semelhante nos grupos de plantas testemunho, tratadas com Ridomil ou com Mancozebe (Tabela 10 e Gráf. 9); contudo, nestes três grupos de plantas essa variação é significativa e particularmente acentuada aos 55 dae, relativamente aos valores dos 41 dae. As plantas pulverizadas com Decis evidenciaram um comportamento diferente, pois as variações observadas ao longo do tempo eram sempre significativas. Foi quantificado um decréscimo aos 41 dae (após 2ª aplicação) da ordem dos 27%, relativamente ao valor dos 24 dae (após 1ª aplicação), diminuição que atingiu 32% depois do 3º tratamento. Contrariamente, na última colheita de material a actividade respiratória surgiu aumentada cerca de 49%, em relação à colheita anterior (Tabela 10 e Gráf. 9).

Comparativamente com as plantas controlo a actividade respiratória surgiu estimulada depois da 1ª aplicação com Decis, que se traduziu num aumento de cerca de 26%. Esta diferença desapareceu com os tratamentos subsequentes, contudo, aos 67 dae, voltou

a registar-se um aumento da actividade respiratória nas plantas tratadas (Tabela 10 e Gráf. 9).

Tabela 10 - Valores da actividade respiratória em plantas controlo e pulverizadas com os agroquímicos.

	Actividade Respiratória ($\mu molO_2$/min./gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$0,598 \pm 0,016^{a}$	$0,752 \pm 0,030^{*a}$	$0,573 \pm 0,047^{a}$	$0,617 \pm 0,044^{a}$
41 dae	$0,578 \pm 0,033^{a}$	$0,547 \pm 0,038^{b}$	$0,558 \pm 0,011^{a}$	$0,593 \pm 0,007^{a}$
55 dae	$0,387 \pm 0,034^{b}$	$0,374 \pm 0,011^{c}$	$0,350 \pm 0,006^{b}$	$0,365 \pm 0,013^{b}$
67 dae	$0,413 \pm 0,015^{b}$	$0,559 \pm 0,001^{*d}$	$0,351 \pm 0,043^{b}$	$0,405 \pm 0,033^{b}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

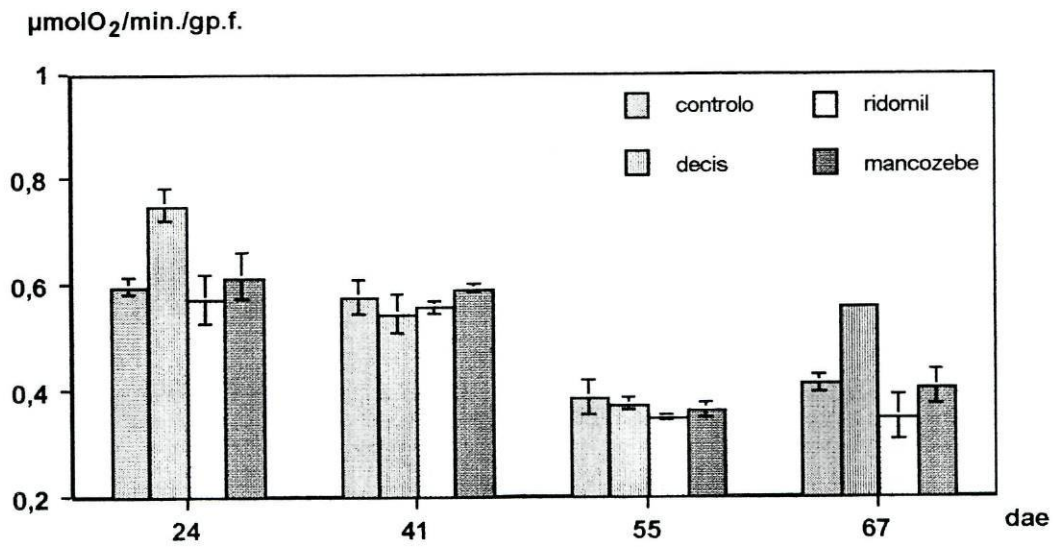


Gráfico 9 - Variação da actividade respiratória ao longo do tempo, nos quatro grupos de plantas. A actividade respiratória nas folhas das plantas pulverizadas com Decis surge significativamente aumentada aos 24 e aos 67 dae. Valores expressos como médias ± E.P.

O tratamento das plantas com os fungicidas não provocou variações na actividade respiratória, encontrando-se nestes dois grupos de plantas valores idênticos aos das plantas controlo, quer após cada pulverização com os agroquímicos (24, 41 e 55 dae), quer na última colheita de material foliar (67 dae), como se pode verificar da análise do Gráfico 9 e dos valores da Tabela 10.

- Zinco e Manganésio

Dado que dois dos agroquímicos utilizados (Ridomil e Mancozebe) são compostos que contêm zinco e manganésio, considerou-se importante a quantificação dos níveis dos iões zinco e manganésio nas folhas das plantas. A análise dos resultados obtidos mostrou que ao longo do tempo, quer nas plantas controlo, quer nas plantas tratadas com Decis não ocorriam flutuações significativas, apresentando estes dois grupos de plantas valores muito próximos para o teor de zinco e um padrão de variação muito semelhante ao longo do tempo (Tabela 11 e Gráf. 10). Ao contrário, nas plantas tratadas com os fungicidas o comportamento era distinto do referido para os dois primeiros grupos de plantas (Controlo e Decis), como se pode observar pela análise do Gráfico 10 e Tabela 11.

Tabela 11 - Níveis de zinco encontrados nas folhas das plantas controlo e tratadas.

	Zinco (µg/gp.s.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	46,73 ± 1,94^{a}	45,70 ± 1,54^{a}	72,37 ± 2,67^{*a}	51,65 ± 2,59^{a}
41 dae	43,83 ± 1,61^{a}	41,63 ± 2,57^{a}	99,60 ± 5,72^{*b}	50,73 ± 5,93^{a}
55 dae	44,50 ± 1,85^{a}	40,70 ± 7,50^{a}	103,47 ± 4,81^{*b}	66,70 ± 5,33^{*a}
67 dae	40,20 ± 1,06^{a}	37,40 ± 1,20^{a}	82,33 ± 4,47^{*c}	59,90 ± 7,80^{*a}

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

Nas plantas pulverizadas com o fungicida sistémico Ridomil encontraram-se variações significativas no teor de zinco ao longo do ciclo cultural. Após a 2ª pulverização (41 dae) registou-se um aumento de cerca de 38% em relação aos 24 dae, variação que deixou de ter significado após o 3º tratamento (55 dae). Curiosamente, aos 67 dae, relativamente à colheita anterior (55 dae), os níveis de zinco decresceram correspondendo a uma diminuição de cerca de 20%. Em qualquer uma das colheitas, os valores quantificados nas folhas das plantas pulverizadas com Ridomil eram sempre superiores aos das plantas testemunho (Tabela 11 e Gráf. 10). Inicialmente, aos 24 dae, o valor era superior ao do controlo de cerca de 55%, diferença que aumentou para 127% aos 41 dae e que se manteve aos 55 dae. Nas folhas destas plantas, aos 67 dae, o nível de zinco continuava a ser superior ao do controlo (cerca de 105%).

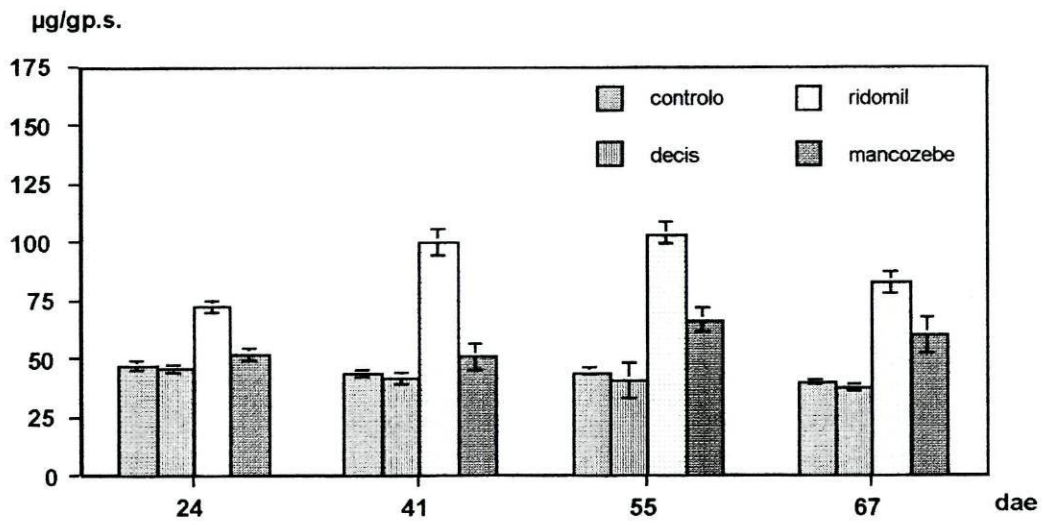


Gráfico 10 - Teor de zinco, expresso em µg/gp.s. De salientar os elevados níveis de zinco encontrados nas folhas das plantas tratadas com Ridomil. Valores expressos como médias ± E.P.

O 1º e 2º tratamentos com Mancozebe não alterava o teor de zinco (Tabela 11); no entanto, após a 3ª aplicação (55 dae) foi quantificado um valor superior ao do controlo de cerca de 50%, situação que se manteve inalterada aos 67 dae.

Relativamente ao ião manganésio os resultados mostraram que o insecticida não interferia com a sua acumulação a nível foliar (Tabela 12 e Gráf. 11).

Tabela 12 - Teor de manganésio quantificado nas folhas dos quatro grupos de plantas.

	Manganésio (µg./gp.s.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	44,27 ± 2,26^{a}	43,00 ± 0,80^{a}	123,00 ± 7,51^{*a}	74,65 ± 4,55^{*a}
41 dae	50,17 ± 0,91^{a}	45,50 ± 3,90^{a}	130,00 ± 15,00^{*a}	86,90 ± 1,00^{*a}
55 dae	50,18 ± 1,83^{a}	53,57 ± 4,04^{a}	154,50 ± 6,50^{*a}	80,10 ± 5,40^{*a}
67 dae	51,20 ± 5,70^{a}	51,90 ± 4,30^{a}	127,00 ± 7,00^{*a}	79,10 ± 4,00^{*a}

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).
Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

Contrariamente, os tratamentos com os fungicidas provocavam aumentos dos níveis de manganésio, incremento que era mais acentuado nas plantas pulverizadas com Ridomil (Tabela 12 e Gráf. 11).

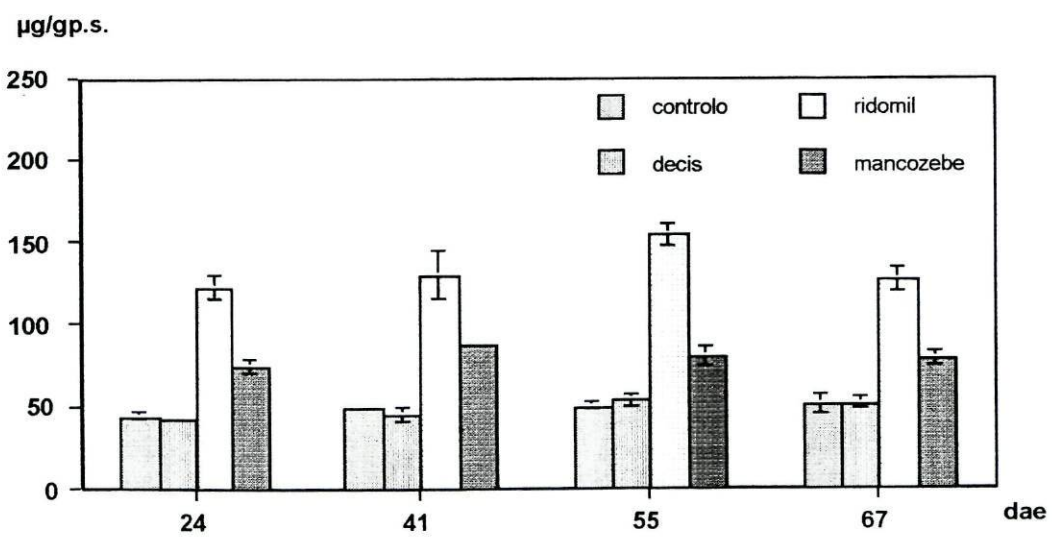


Gráfico 11 - Influência dos tratamentos com os agroquímicos nos níveis de manganésio. De um modo semelhante ao observado para o teor de zinco, foram as plantas tratadas com Ridomil que apresentaram os valores mais elevados de manganésio. Valores expressos como médias ± E.P.

A aplicação de Mancozebe provocou um aumento significativo dos níveis de manganésio. As diferenças encontradas, sempre significativas, foram de cerca de 69%, 73% e 60%, após o 1º, 2º e 3º tratamentos, respectivamente; aos 67 dae, o aumento foi de cerca de 54,5% (Tabela 12 e Gráf. 11).

Estudo ultraestrutural

As células das folhas das plantas controlo mostravam o aspecto normal de células diferenciadas. Caracteristicamente estas células possuem um vacúolo central de grandes dimensões, podendo muitas vezes observar-se no seu interior substâncias floculadas. No citoplasma, reduzido a uma camada periférica comprimida contra a parede celular, como resultado da turgescência do vacúolo, podiam observar-se os organelos e estruturas que são comuns neste tipo de células (Fig. 26).

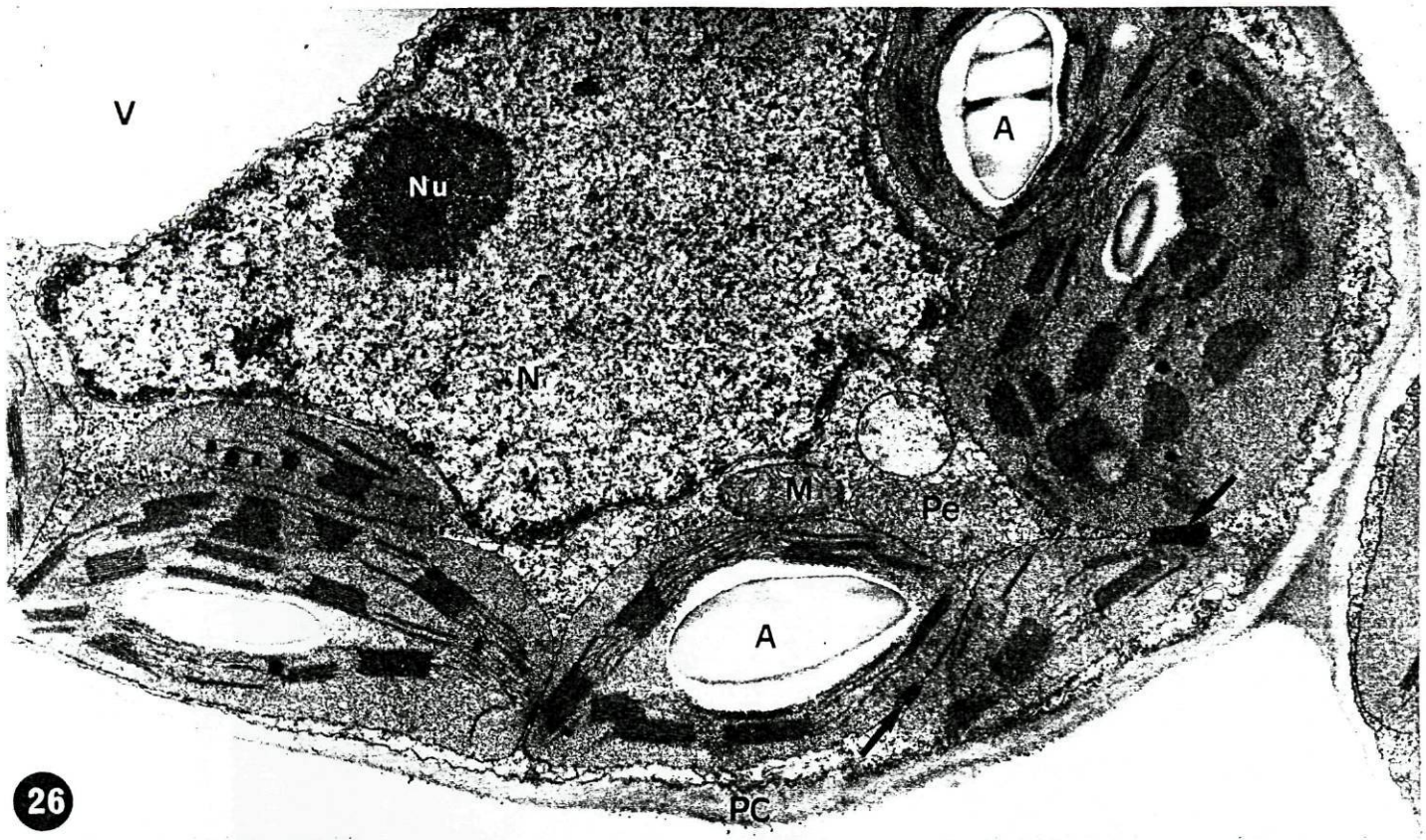
As mitocôndrias que se situavam frequentemente numa situação de contacto com os cloroplastos, apresentavam um aspecto normal. Também junto dos plastídios podiam observar-se peroxissomas, frequentemente com inclusões paracristalinas. Tal como as mitocôndrias, os peroxissomas mostravam a superfície deformada na região de contacto com os cloroplastos (Figs. 27 e 28). O retículo endoplasmático, quase exclusivamente do tipo rugoso, surgia na proximidade do invólucro nuclear e em algumas imagens junto dos cloroplastos (Fig. 27). Com uma certa frequência observava-se material denso em electrões, localizado preferencialmente junto dos plastídios. A ocorrência deste material não parecia estar associada com a idade das plantas, dado que podia ser observado em material colhido aos 24 dae (Figs. 26 e 27), 41 dae (Fig. 35) e 55 dae (Fig. 44). As observações de numerosos perfis de cloroplastos, mostram que estes organelos eram pleomórficos, observando-se por isso, com muita frequência, infundíbulos de citoplasma nos perfis dos cloroplastos (Figs. 27 e 36). Estes organelos apresentavam um sistema membranoso bem desenvolvido, organizado em grana e intergrana, grãos de amido (normalmente, mais do que um grão por perfil de cloroplasto) e numerosos plastoglóbulos osmiofílicos. Estes plastoglóbulos

Figs. 26 a 28 - Mesófilo de *S. tuberosum* de plantas controlo, 24 dae.

Fig. 26 - Porção de uma célula, mostrando núcleo (N), nucléolo (Nu), mitocôndria (M), peroxissoma (Pe), vários cloroplastos com sistema membranoso bem desenvolvido, amido (A) e alguns plastoglóbulos. Nesta imagem pode observar-se material electronodenso, localizado na proximidade de cloroplastos (setas). V - vacúolo; PC - parede celular. 17 000 x.

Fig. 27 - Imagem onde é vísivel cloroplasto mostrando infundíbulo de citoplasma (*), estando também presente amido (A) e plastoglóbulos. Junto do cloroplasto pode ver-se cisternas de retículo endoplasmático (RE), peroxissoma (Pe) e material denso em electrões (seta). 21 000 x.

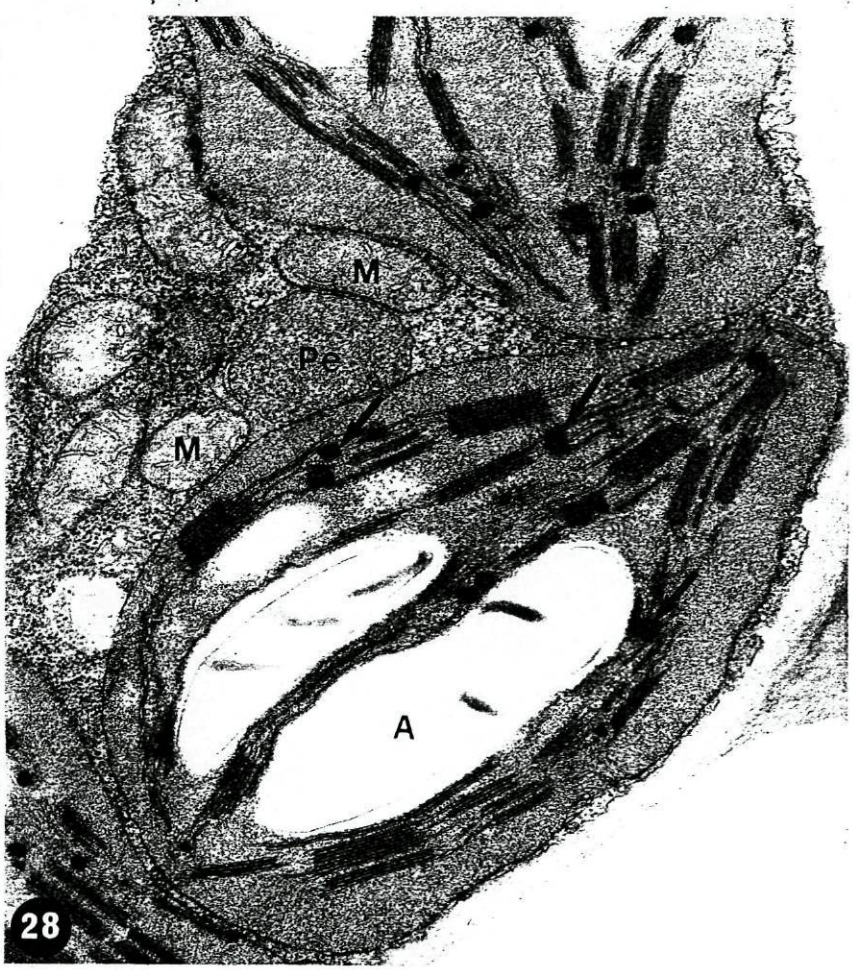
Fig. 28 - Porção de uma célula, podendo observar-se situação de contacto de cloroplastos com mitocôndrias (M) e peroxissoma (Pe). O cloroplasto apresenta sistema fotossintético diferenciado em grana e intergrana, amido (A) e alguns plastoglóbulos (setas). 24 000 x.



26



27



28

Figs. 29 e 30 - Mesófilo de plantas tratadas com Decis, 24 dae (após 1ª aplicação).

Fig. 29 - Imagem para mostrar relações espaciais entre cloroplasto, mitocôndria (M) e peroxissomas (Pe), podendo observar-se num deles inclusão paracristalina. No citoplasma surgem cisternas de retículo endoplasmático (RE), a cujas membranas surgem, por vezes, associados ribossomas. Este material possui também material denso em electrões (seta). De assinalar a ausência de amido no cloroplasto, o qual apresenta sistema lamelar bem desenvolvido e alguns plastoglóbulos. V - vacúolo. 32 400 x.

Fig. 30 - Porção de célula onde é vísivel cloroplasto com sistema fotossintético bem desenvolvido, mostrando amido. V - vacúolo; PC - parede celular. 30 400 x.

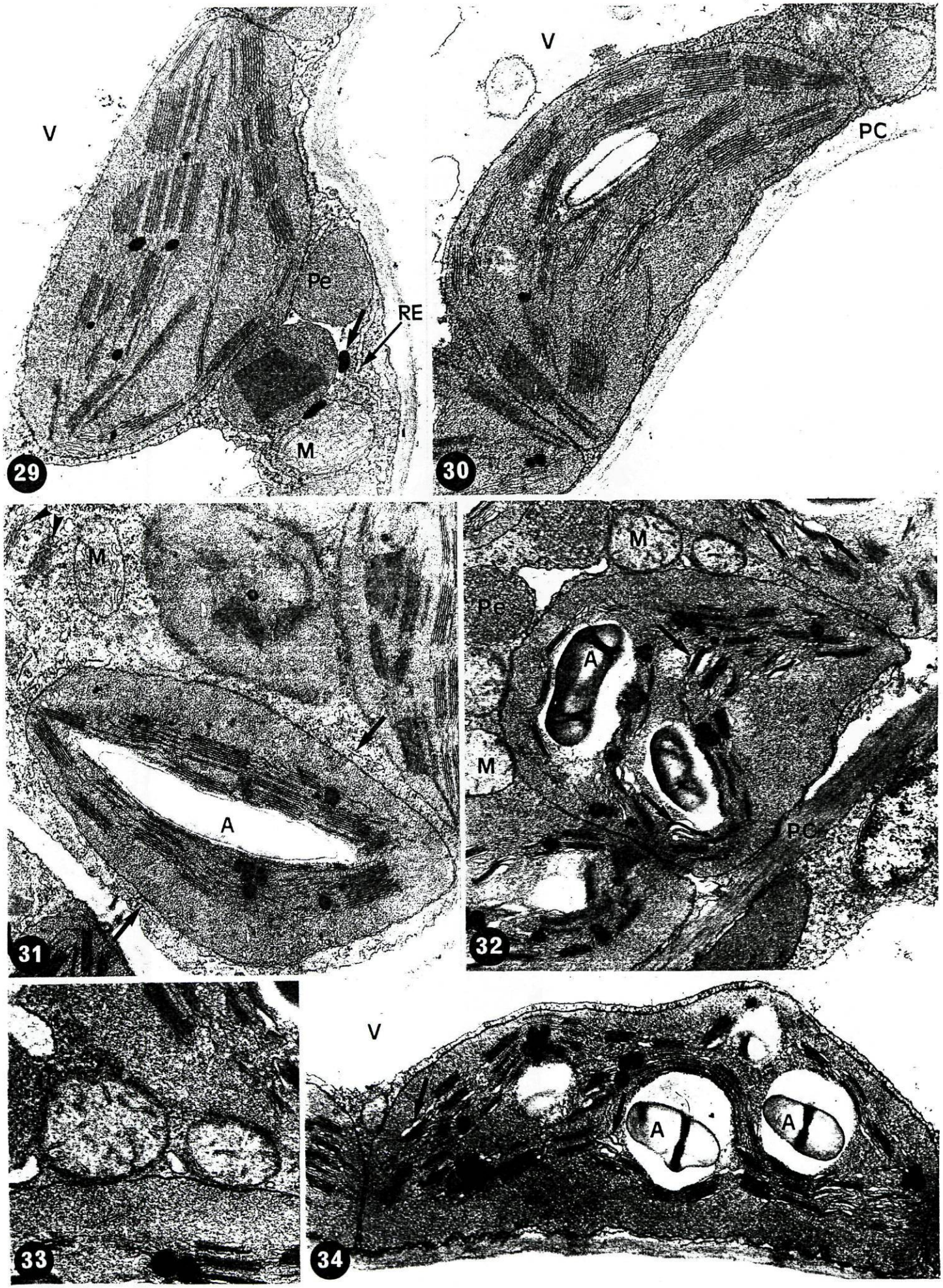
Fig. 31 - Mesófilo de plantas tratadas com Ridomil, 24 dae.
Porção de uma célula mostrando cloroplasto com sistema lamelar bem organizado, plastoglóbulos e amido (A). No citoplasma distiguem-se vários perfis de retículo endoplasmático (setas), mitocôndria (M) e dictiossomas (pontas de setas). 23 400 x.

Figs. 32 a 34 - Folhas de plantas tratadas com Mancozebe, 24 dae.

Fig. 32 - Região de contacto de duas células mesofiliares. No cloroplasto estão presentes vários plastoglóbulos e amido (A), podendo observar-se dilatação dos tilacóides granares e intergranares (setas). As mitocôndrias (M) surgem com aspecto alterado, mostrando diminuição da densidade da matriz e redução das cristas mitocondriais. Na proximidade do cloroplasto e mitocôndrias são vísiveis peroxissomas (Pe). PC - parede celular. 21 600 x.

Fig. 33 - Detalhe de mitocôndrias onde é bem evidente a diminuição da densidade da matriz e redução das cristas mitocondriais. 36 000 x.

Fig. 34 - Imagem de cloroplasto possuindo amido (A) e alguns plastoglóbulos, onde são também notórias as alterações que surgem no sistema lamelar (setas). V - vacúolo. 24 000 x.


V
Pe
RE
M
29
V
PC
30
M
A
31
M
Pe
A
M
PC
32
33
V
A
A
34

surgiam com maiores dimensões e tornavam-se menos osmiofílicos, à medida que aumentava a idade das plantas (Figs. 44 e 45).

Nas folhas tratadas com Decis a ultraestrutura geral das células era semelhante à das do material controlo. Os cloroplastos também apresentavam grana bem desenvolvido, grãos de amido e plastoglóbulos dispersos no estroma. No entanto, a observação de numerosos perfis destes organelos sugeria que haviam diferenças quantitativas na sua estrutura o que foi confirmado por análise morfométrica. Em particular, depois da 1ª aplicação de Decis (24 dae), a diferença mais notória relativamente ao controlo, era a diminuição do teor em amido (Figs. 29 e 30). Este decréscimo nos grãos de amido era mais pronunciado depois do 2º tratamento com o insecticida (41 dae) (Figs. 37 e 39), situação que parecia manter-se inalterada depois da 3º pulverização (55 dae) (Figs. 46 e 47). A análise de numerosos perfis de cloroplastos sugeria também que os cloroplastos das folhas tratadas, possuíam um número mais elevado de tilacóides por grana, depois do 2º e 3º tratamentos, do que nas folhas controlo com a mesma idade (Figs. 37, 39, 46 e 47). As restantes estruturas celulares apresentavam um aspecto normal e semelhante ao observado nas imagens das folhas controlo. Tal como neste material, o tratado com Decis possuía também material electronodenso (Figs. 29 e 47).

O tratamento com Ridomil não provocava inicialmente alterações, pois as células revelavam um aspecto normal. Após o 1º tratamento (24 dae), os cloroplastos apresentavam grana bem desenvolvido, observando-se normalmente a presença de amido (Fig. 31). No entanto, depois da 2ª aplicação (41 dae) várias imagens mostravam que surgiam alterações ultraestruturais, que se manifestavam unicamente a nível dos cloroplastos e que se traduziam pela dilatação dos tilacóides (Fig. 40), a qual se tornava menos acentuada após o último tratamento. De facto, aos 55 dae, podiam observar-se algumas imagens onde nos cloroplastos era ainda vísivel algum grau de dilatação dos tilacóides (Fig. 48), enquanto que em outras o sistema membranoso apresentava o aspecto normal (Fig. 49). Neste material tratado com Ridomil observava-se também material denso em electrões (Fig. 40 e 48).

Figs. 35 e 36 - Folhas de plantas controlo (41 dae).

Fig. 35 - Porção de uma célula do mesófilo, na qual se vê parte do núcleo (N) e cloroplasto evidenciando sistema lamelar bem organizado, amido (A) e plastoglóbulos. Pode também observar-se peroxissoma (Pe) com inclusão paracristalina e mitocôndrias (M), que surgem com aspecto normal. Junto aos cloroplastos encontra-se material electronodenso (setas). 17 600 x.

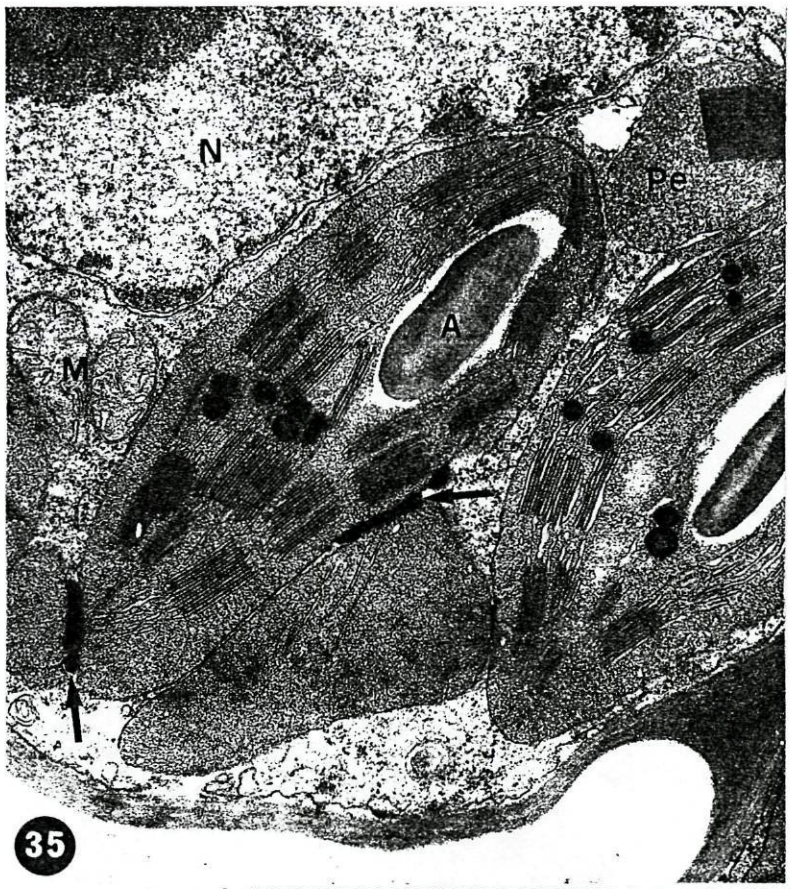
Fig. 36 - Imagem mostrando região de contacto de duas células mesofiliares. São vísiveis infundíbulos de citoplasma (*) no cloroplasto, o qual apresenta sistema fotossintético bem desenvolvido, amido e plastoglóbulos. 20 000 x.

Figs. 37 a 39 - Folhas de plantas após 2º tratamento com Decis (41 dae).

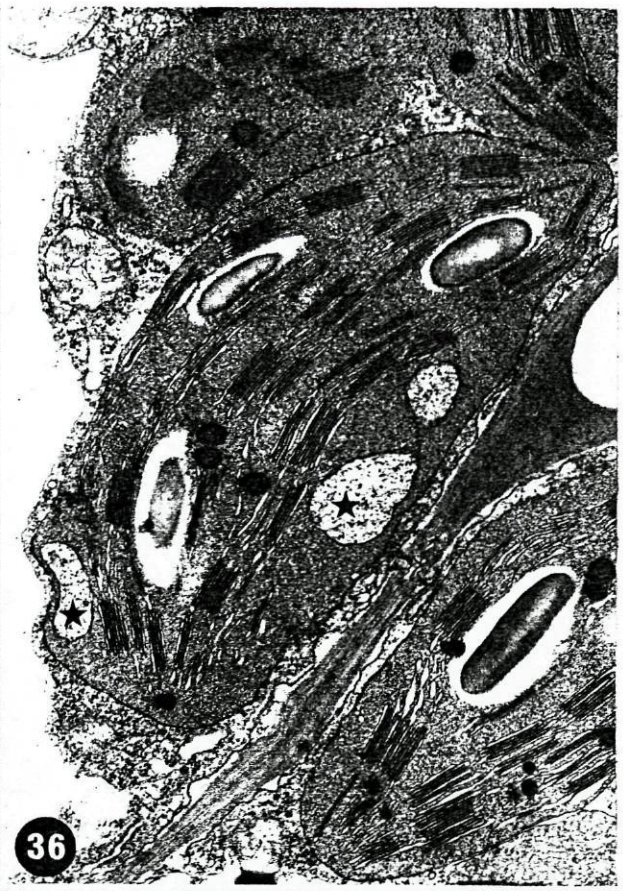
Fig. 37 - Faixa citplasmática onde se vêm longas cisternas de retículo endoplasmático (RE), cloroplastos com organização semelhante à dos das folhas controlo, mas possuindo menos amido (comparar com Figs. 35 e 36). V - vacúolo; PC - parede celular. 26 600 x.

Fig. 38 - Imagem para mostrar situação de contacto de mitocôndrias (M), que surgem com matriz normal e regular distribuição das cristas e peroxissoma (Pe), no qual se distingue inclusão paracristalina. 45 600 x.

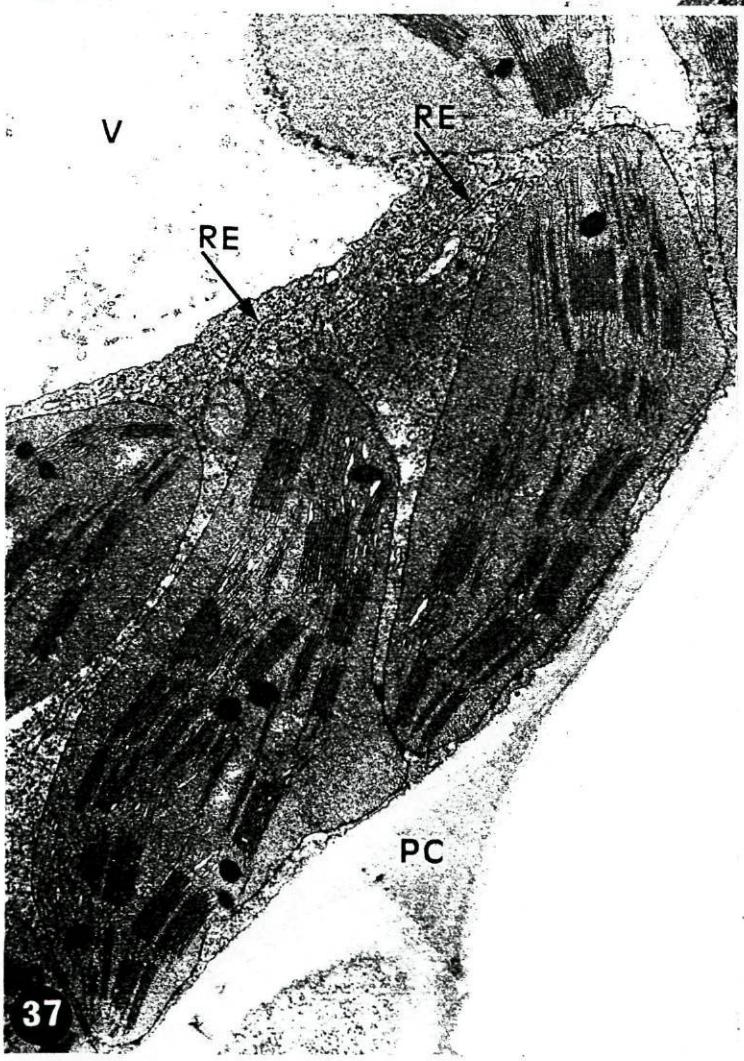
Fig. 39 - Imagem de cloroplasto com sistema lamelar bem desenvolvido, podendo observar-se mitocôndrias (M) na sua proximidade. V - vacúolo; PC - parede celular. 28 000 x.



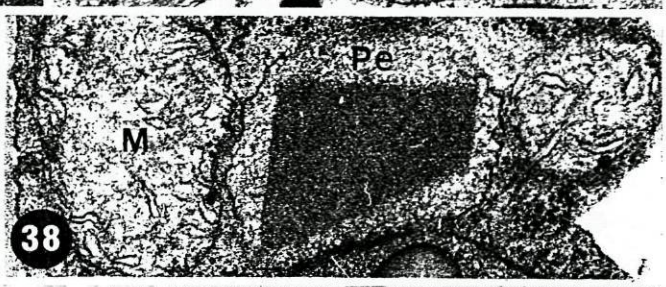
35



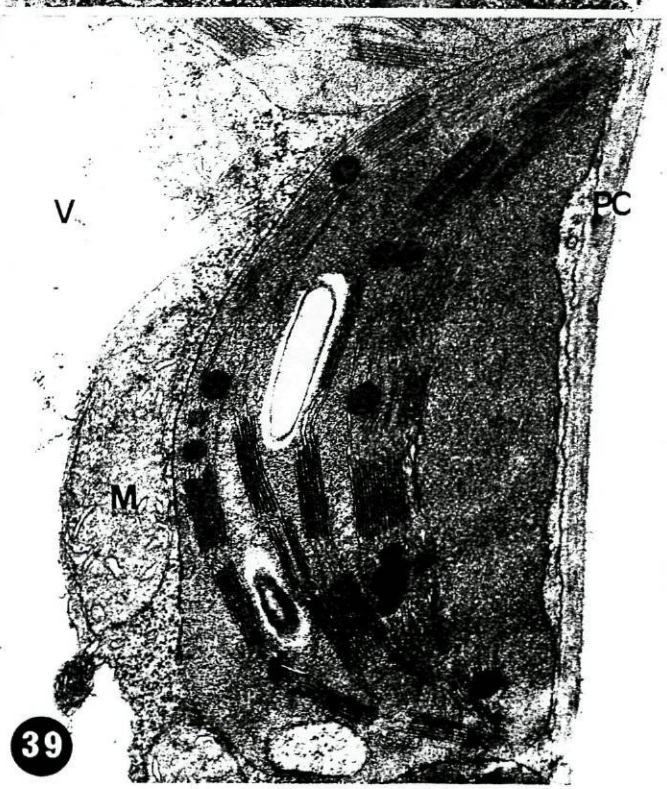
36



37



38



39

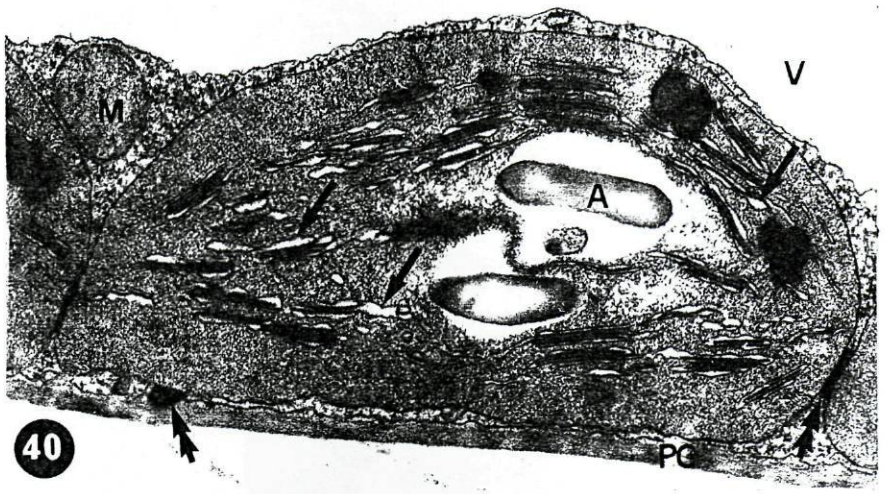
Fig. 40 - Material foliar após 2º tratamento com Ridomil (41 dae).
Imagem que mostra cloroplasto possuindo amido (A) e alguns plastoglóbulos. A alteração mais notória que surge neste material é a dilatação dos tilacóides granares e intergranares (setas). Observa-se também material electronodenso (setas duplas) e mitocôndria (M) junto ao cloroplasto. V - vacúolo; PC - parede celular. 22 400 x.

Figs. 41 a 43 - Folhas de plantas tratadas com Mancozebe, após 2ª aplicação (41 dae).

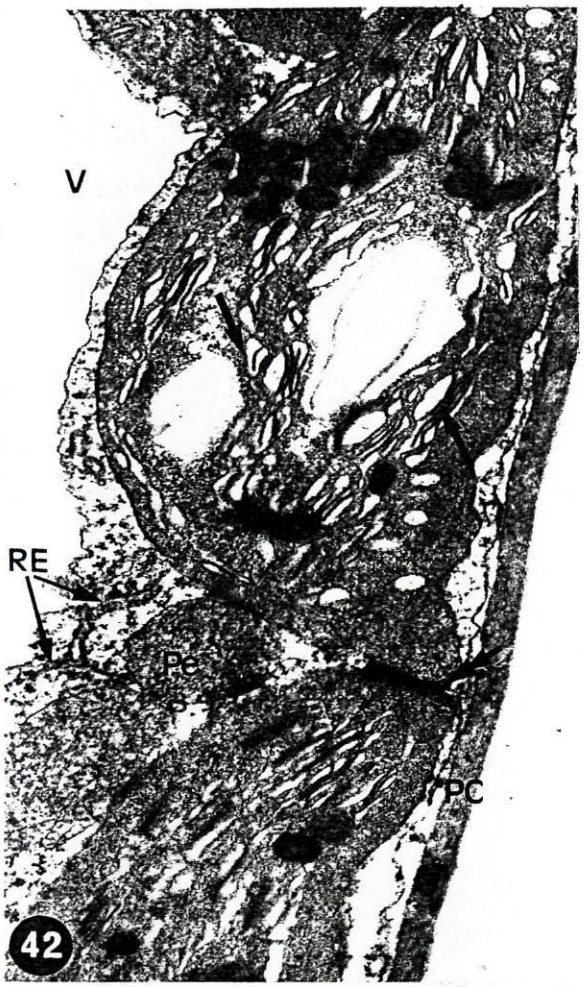
Fig. 41 - Região de contacto de duas células do mesófilo. No citoplasma pode observar-se cisternas de retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria (M), que surge com aspecto alterado, mostrando redução do número de cristas e menor densidade da matriz. As setas duplas indicam material denso em electrões na proximidade dos cloroplastos, os quais possuem amido (A) e vários plastoglóbulos. V - vacúolo; PC - parede celular. 27 300 x.

Fig. 42 - Faixa de citoplasma onde são vísiveis peroxissomas (Pe), retículo endoplasmático (RE) e cloroplastos com grãos de amido, plastoglóbulos e sistema membranoso fotossintético mostrando dilatação dos tilacóides (setas), que surge mais acentuada do que no material tratado com Ridomil (comparar com Fig. 40). Neste material também pode observar-se material denso em electrões na proximidade dos cloroplastos (seta dupla). V - vacúolo; PC - parede celular. 22 000 x.

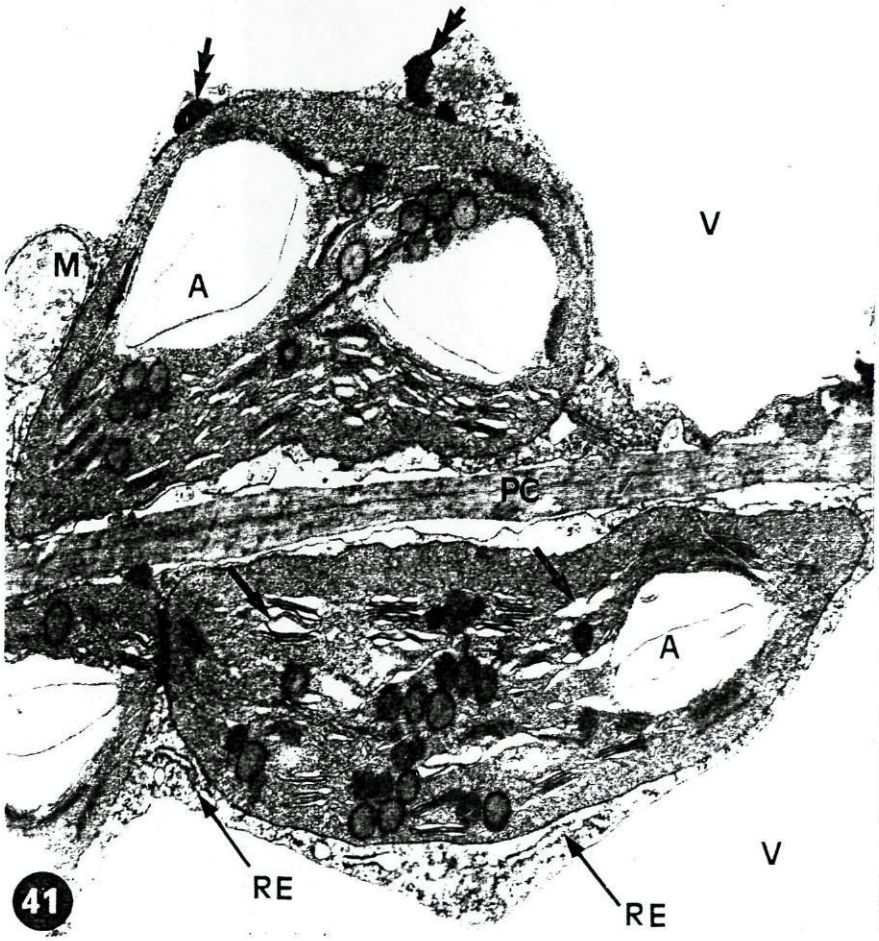
Fig. 43 - Pormenor de cloroplasto para mostrar o elevado grau de dilatação dos tilacóides (setas). 45 600 x.



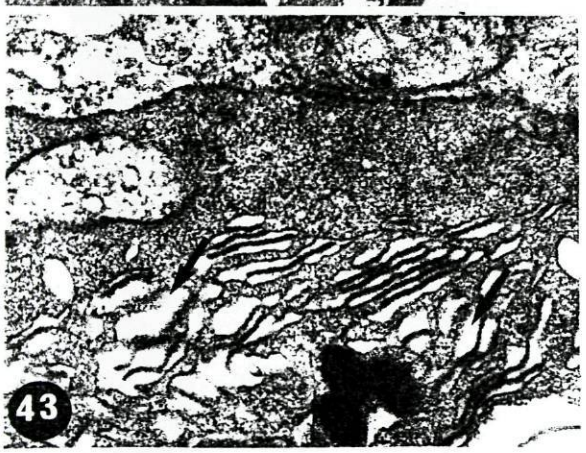
40



42



41



43

Os tratamentos com Mancozebe provocavam também algumas alterações ultraestruturais, que surgiam do mesmo modo predominantemente a nível dos cloroplastos. O tipo de alteração provocada por este fungicida apresentava alguma semelhança com a alteração induzida pelo outro fungicida, o Ridomil. De facto, após o 1º tratamento (24 dae) observava-se algum grau de dilatação dos tilacóides granares e intergranares (Figs. 32 e 34), situação que era ainda mais pronunciada no material colhido após a 2ª pulverização (41 dae) com o fungicida (Figs. 41, 42 e 43). Adicionalmente, era possível observar que, após os dois primeiros tratamentos com o agroquímico, as mitocôndrias surgiam afectadas, mostrando diminuição da densidade da matriz (Figs. 33 e 41). Os plastoglóbulos presentes no material tratado apresentavam um aspecto semelhante ao dos do material controlo. Depois da 3ª pulverização com Mancozebe (55 dae) era ainda possível observar alguma dilatação dos tilacóides, em particular dos grana (Figs. 50 e 51); no entanto, as imagens mostravam que tinha ocorrido uma certa recuperação da estrutura normal, recuperação essa que se manifestava também a nível das mitocôndrias (Fig. 50, encaixe), que apresentavam o mesmo aspecto que as das células das folhas controlo. As imagens observadas do material tratado com Mancozebe após cada um dos três tratamentos, sugeriam a presença de menos amido nos cloroplastos comparativamente ao controlo. Material electronodenso estava também presente no material foliar tratado com Mancozebe (Figs. 41, 42 e 51).

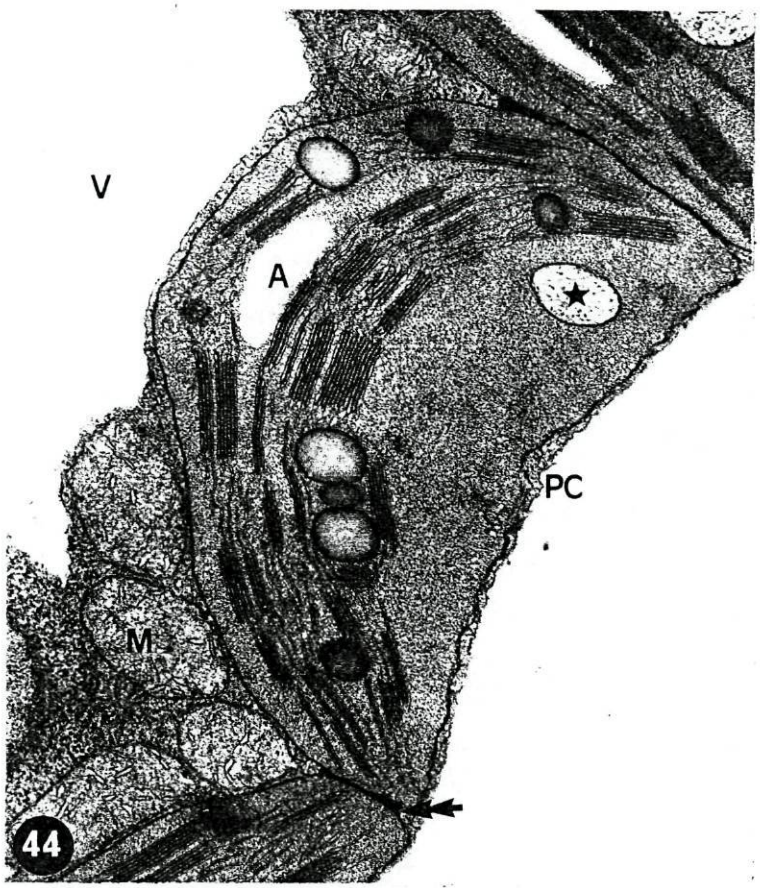
Do estudo ultraestrutural realizado pode dizer-se que os cloroplastos são os organelos que surgem mais afectados pelo tratamento com os agroquímicos, dado que as alterações mais evidentes detectadas nas folhas das plantas tratadas ocorriam principalmente a nível destes organelos. As alterações ultraestruturais provocadas pelo Mancozebe e as induzidas pelo Ridomil eram muito semelhantes, o que está provavelmente relacionado com o facto deste fungicida sistémico possuir na sua composição mancozebe, para além de metalaxil.

Figs. 44 e 45 - Material foliar controlo colhido aos 55 dae.
Porções celulares onde se observam cloroplastos com sistema fotossintético bem organizado, grãos de amido (A) e plastoglóbulos mais volumosos e menos electronodensos do que os observados aos 24 e 41 dae (comparar com Figs. 27, 28, 35 e 36). No citoplasma é também vísivel material denso em electrões na região de contacto dos cloroplastos (seta dupla) e localizadas na sua proximidade podem observar-se várias mitocôndrias (M), que têm um aspecto normal. V - vacúolo; PC - parede celular. (*) - infundíbulo de citoplasma.
Fig. 44 - 31 200 x. Fig. 45 - 20 000 x.

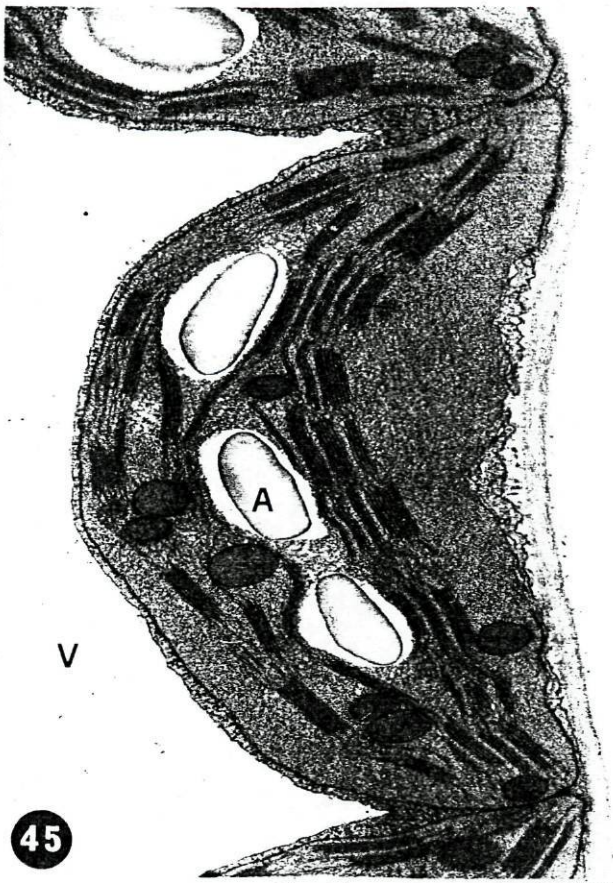
Figs. 46 e 47 - Folhas de plantas tratadas com Decis, após 3ª aplicação (55 dae).

Fig. 46 - Porção de uma célula na qual se vê cloroplasto com sistema lamelar desenvolvido, com um maior número de tilacóides em cada grana do que o observado no material controlo (comparar com Figs. 44 e 45), estando presente retículo endoplasmático (setas) na sua proximidade. De assinalar, também, a ausência de amido no cloroplasto, comparativamente com o controlo (comparar com Figs. 44 e 45). 33 600 x.

Fig. 47 - Imagem de cloroplasto mostrando um elevador número de tilacóides em cada grana. Os plastoglóbulos surgem, tal como na imagem anterior, com aspecto semelhante aos do material controlo (comparar com Figs. 44 e 45). A seta dupla indica material denso em electrões. V - vacúolo; PC - parede celular. 31 200 x.



44



45



46



47

Figs. 48 e 49 - Porções de células de mesófilo de material colhido após 3ª aplicação de Ridomil (55 dae).

Fig. 48 - Imagem onde se pode observar que a dilatação dos tilacóides é menos acentuada do que aos 41 dae (comparar com Fig. 40). No citoplasma está presente retículo endoplasmático (RE) e material electronodenso (seta). 19 200 x.

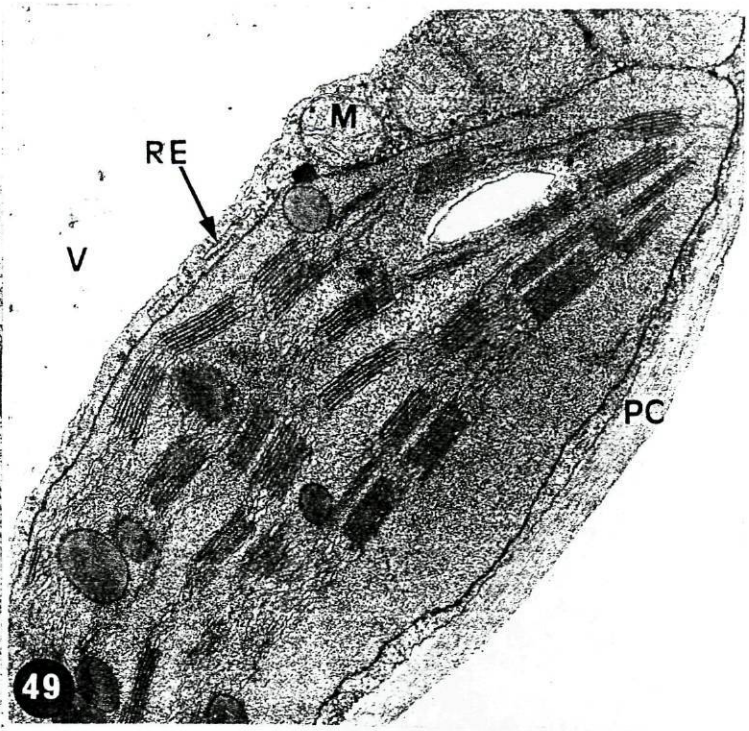
Fig. 49 - Faixa de citoplasma com mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (RE) e cloroplasto com aspecto indistinguível do do material controlo (comparar com Figs. 44 e 45). V - vacúolo; PC - parede celular. 24 000 x.

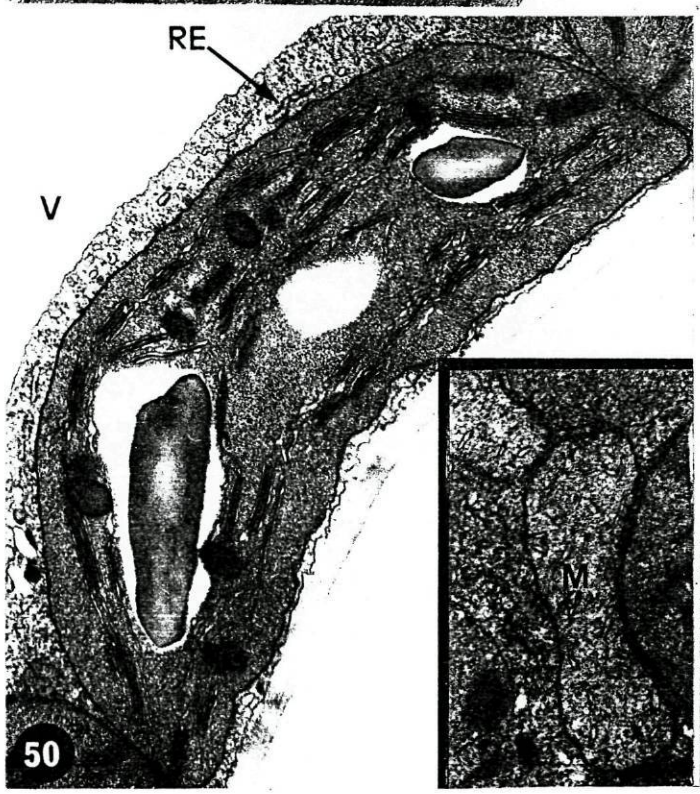
Figs. 50 e 51 - Material foliar após 3º tratamento com Mancozebe (55 dae).

Fig. 50 - Imagem onde se observa cloroplasto que mostra dilatação dos tilacóides; no entanto, verifica-se que ocorreu uma certa recuperação da estrutura normal. A recuperação manifestava-se também a nível das mitocôndrias (M) como é vísivel no "encaixe". Junto do cloroplasto, que possui amido e alguns plastoglóbulos com aspecto semelhante aos do controlo, são vísiveis perfis de retículo endoplasmático (RE). V - vacúolo. 26 400 x. "Encaixe" - 26 400 x.

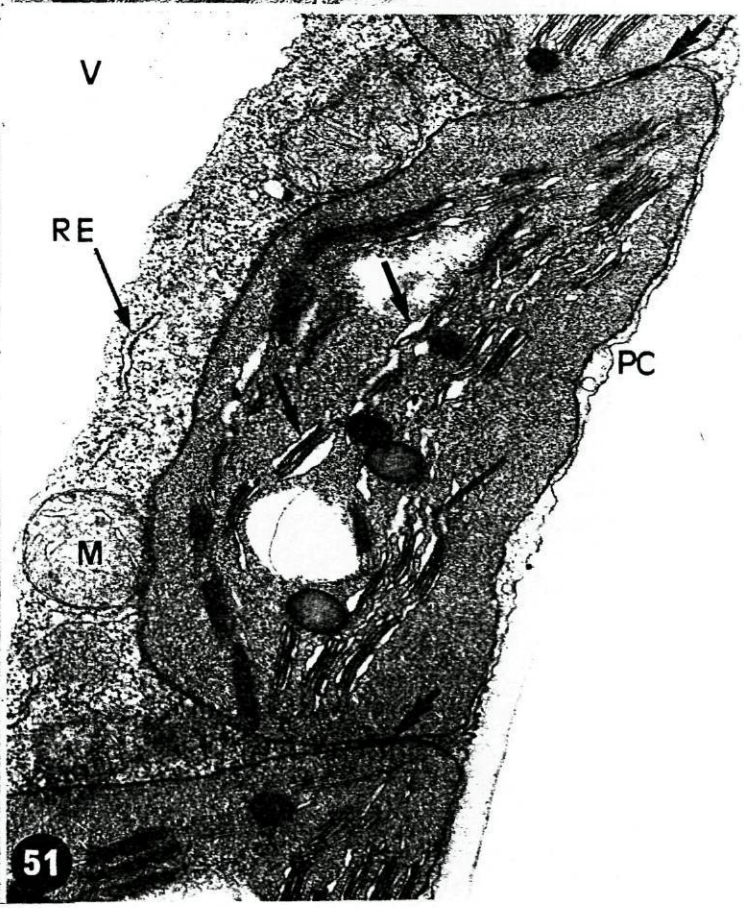
Fig. 51 - Faixa de citoplasma onde se pode ver cisternas de retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias (M), que surgem com aspecto semelhante às do material foliar controlo (comparar com Fig. 44) e cloroplasto, onde ainda se pode observar dilatação dos tilacóides (seta), que surge, no entanto, menos acentuada do que no material foliar colhido após a 2ª aplicação do fungicida (comparar com Figs. 41, 42 e 43). As setas duplas indicam material electronodenso localizado numa situação de contacto com cloroplastos. V - vacúolo; PC - parede celular. 30 000 x.


RE
48


M
RE
V
PC
49


RE
V
50

M


V
RE
PC
M
51

Análise morfométrica ultraestrutural

As imagens ultraestruturais mostravam parecer existir diferenças entre o material controlo e o tratado com os agroquímicos a nível da quantidade de amido. Para confirmar a ideia sugerida pelas numerosas imagens, realizou-se um estudo morfométrico para as quatro situações estudadas, em que se determinou o volume fraccional do amido em relação aos cloroplastos (Vv am./clor.) e destes organelos relativamente a uma malha (Vv clor./ma.).

O estudo morfométrico ultraestrutural mostrou que o volume fraccional dos cloroplastos (Vv clor./ma.) era menor nas folhas das plantas tratadas com Decis do que nas folhas controlo.

Tabela 13 - Volume fraccional dos cloroplastos em relação a uma malha (Vv cloroplasto/malha).

	Vv cloroplasto/malha			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	53,05 ± 4,72^{a}	37,51 ± 2,64^{*a}	46,86 ± 2,47^{a}	57,33 ± 2,59^{a}
41 dae	44,05 ± 2,84^{a}	31,21 ± 2,02^{*a}	56,97 ± 2,61^{*b}	46,81 ± 2,64^{b}
55 dae	37,51 ± 2,86^{a}	33,60 ± 2,06^{a}	53,87 ± 2,18^{*b}	37,93 ± 1,98^{c}

Valores médios expressos como percentagem ± E.P. (n=30). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

Na Tabela 13 pode ver-se que o Vv clor./ma. das folhas colhidas após o 1º tratamento com Decis (24 dae) era inferior em cerca de 29% ao valor do controlo e que se mantinha inalterada depois da 2ª aplicação (41 dae). No entanto, após o último tratamento (55 dae), essa diferença no Vv clor./ma. deixou de ter significado estatístico (Tabela 13 e Gráf.12).

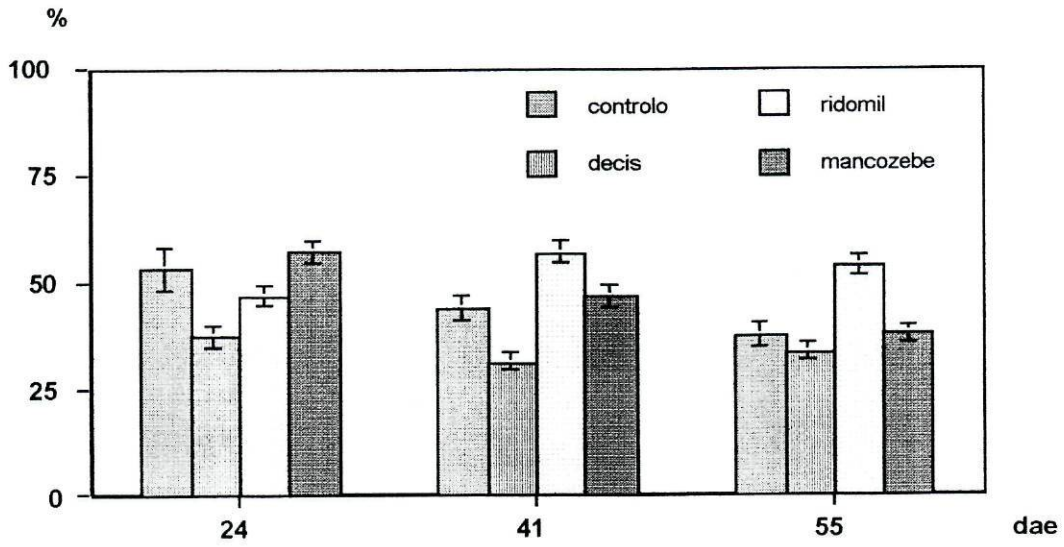


Gráfico 12 - Influência dos tratamentos com os agroquímicos no volume fraccional dos cloroplastos, após cada uma das pulverizações. Valores médios expressos como percentagem ± E.P.

A análise estereológica mostrou também que o volume fraccional do amido em relação aos cloroplastos (Vv am./clor.) era também sempre inferior no material tratado com Decis em relação ao controlo. Aos 24 dae o Vv am./clor. surgia diminuído cerca de 58%, diferença que aumentava para 72%, após a 2ª pulverização (41 dae), baixando para cerca de 66% aos 55 dae (Tabela 14 e Gráf. 13).

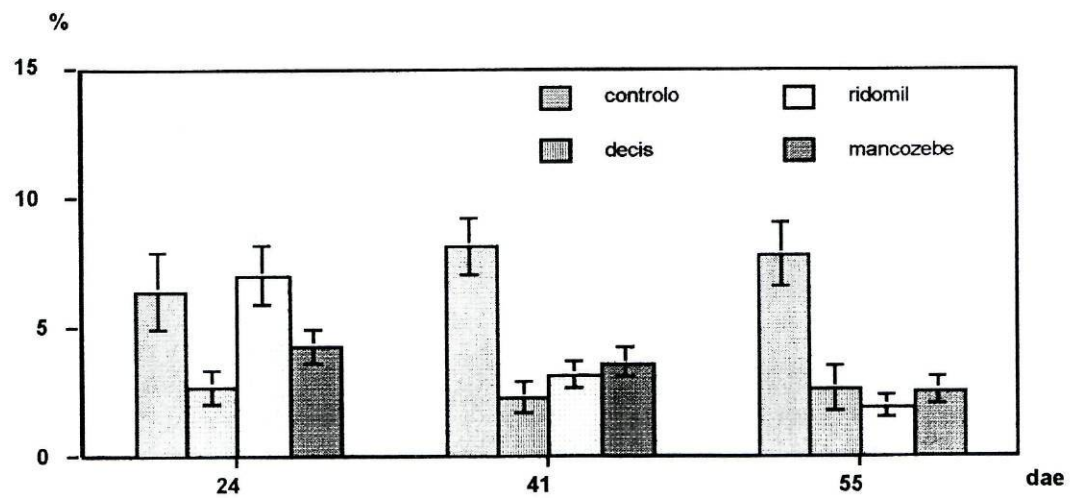


Gráfico 13 - Volume fraccional do amido em relação aos cloroplastos. Como se pode observar o Vv am./clor., aos 41 e 55 dae, surge acentuadamente diminuído em todas as plantas tratadas comparativamente ao controlo. Valores médios expressos como percentagem ± E.P.

A aplicação de Ridomil às plantas, não conduzia inicialmente a alterações significativas no volume fraccional dos cloroplastos relativamente ao controlo; contudo, após o 2º tratamento (41 dae), o Vv clor./ma. surgia aumentado cerca de 29%, diferença que se acentuava para 44% aos 55 dae, ou seja, depois do último tratamento com este agroquímico (Tabela 13 e Gráf.12).

A determinação do volume fraccional do amido relativamente aos cloroplastos mostrou que não existiam diferenças entre as plantas tratadas com Ridomil e o controlo após a 1ª aplicação, de uma maneira semelhante à observada para o volume fraccional dos cloroplastos. Ao contrário, aos 41 e 55 dae, o Vv am./clor. era menor nas plantas tratadas, tendo sido encontrada uma diferença de cerca de 61% após a 2ª aplicação (41 dae), que se acentuava para 75% depois da última pulverização (55 dae) (Tabela 14 e Gráf. 13).

Tabela 14 - Valores obtidos para o volume fraccional do amido em relação aos cloroplastos (Vv amido/cloroplasto).

	Vv amido/cloroplasto			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
24 dae	$6,41 \pm 1,47^{a}$	$2,72 \pm 0,65^{*a}$	$7,03 \pm 1,15^{a}$	$4,29 \pm 0,67^{a}$
41 dae	$8,13 \pm 1,13^{a}$	$2,29 \pm 0,60^{*a}$	$3,21 \pm 0,51^{*b}$	$3,66 \pm 0,56^{*a}$
55 dae	$7,84 \pm 1,24^{a}$	$2,66 \pm 0,85^{*a}$	$1,97 \pm 0,46^{*b}$	$2,59 \pm 0,51^{*a}$

Valores médios expressos como percentagem ± E.P. (n=30). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo ($P<0,05$).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior ($P<0,05$).

A análise morfométrica dos cloroplastos das folhas tratadas com Mancozebe mostrou que este fungicida de contacto, não provocava alterações do Vv clor./ma. (Tabela 13 e Gráf. 12). Ao contrário, o volume fraccional do amido relativamente aos cloroplastos era

menor nas plantas tratadas, com diminuições de cerca de 55% e 67%, após o 2º e 3º tratamentos, respectivamente (Tabela 14 e Gráf. 13).

3.2. Estudos em tubérculos

Determinações bioquímicas realizadas aos 33 e 77 dae

- ADP-glucose pirofosforilase (EC 2.7.7.27)

Para avaliar se as alterações fisiológicas que ocorreram nas plantas, como resposta aos agroquímicos aplicados, tinham repercussões no processo de tuberização foram realizadas determinações da actividade da enzima ADP-glucose pirofosforilase em tubérculos em diferentes fases de desenvolvimento. As Figs. 52A e 52B mostram as dimensões dos tubérculos colhidos aos 33 e 77 dae, respectivamente e que foram utilizados para o nosso estudo. Os primeiros com um peso de 18-20 g e diâmetro aproximado de 3 cm, os segundos com 70-80 g e com cerca de 5 cm de diâmetro.

A actividade desta enzima era semelhante aos 33 dae, nos tubérculos provenientes das plantas tratadas e nos tubérculos controlo (Tabela 15 e Gráf. 14). Contudo, nos tubérculos colhidos aos 77 dae, surgiram diferenças sendo a actividade da ADP-glucose pirofosforilase nos tubérculos provenientes das plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe menor do que nos tubérculos controlo.

Tabela 15 - Valores obtidos para a actividade da enzima ADP-glucose pirofosforilase em tubérculos provenientes dos quatro grupos de plantas.

	ADP-glucose pirofosforilase (µmol glucose-1-P/gp.f./min.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
33 dae	$1,569 \pm 0,048^{a}$	$1,609 \pm 0,095^{a}$	$1,658 \pm 0,080^{a}$	$1,681 \pm 0,100^{a}$
77 dae	$1,130 \pm 0,034^{b}$	$1,145 \pm 0,012^{b}$	$0,895 \pm 0,028^{*b}$	$0,845 \pm 0,060^{*b}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo ($P<0,05$).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior ($P<0,05$).

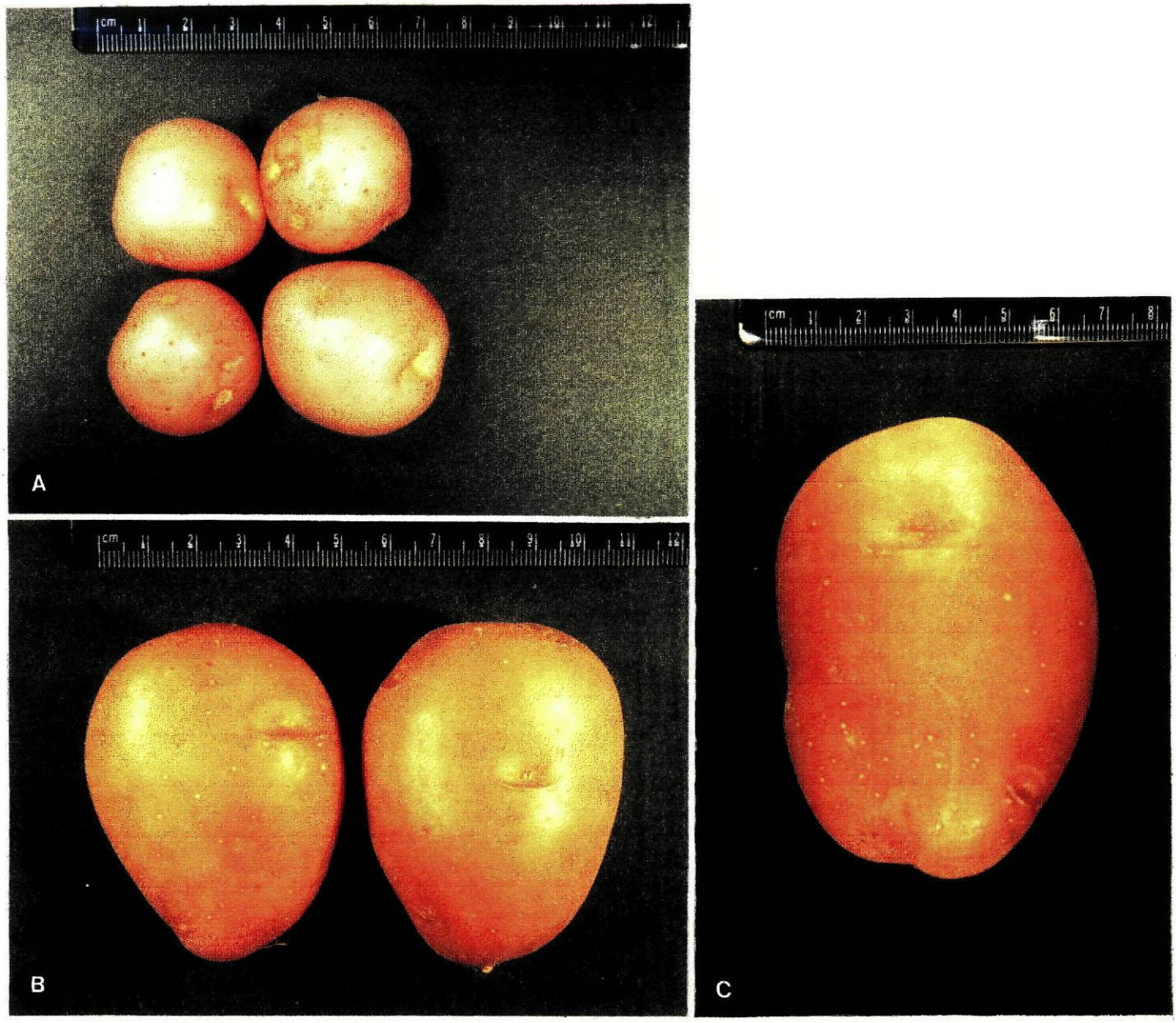


Fig. 52 - Tubérculos colhidos em plantas de batateira aos 33 dae (A), 77 dae (B) e no fim do ciclo cultural (C).

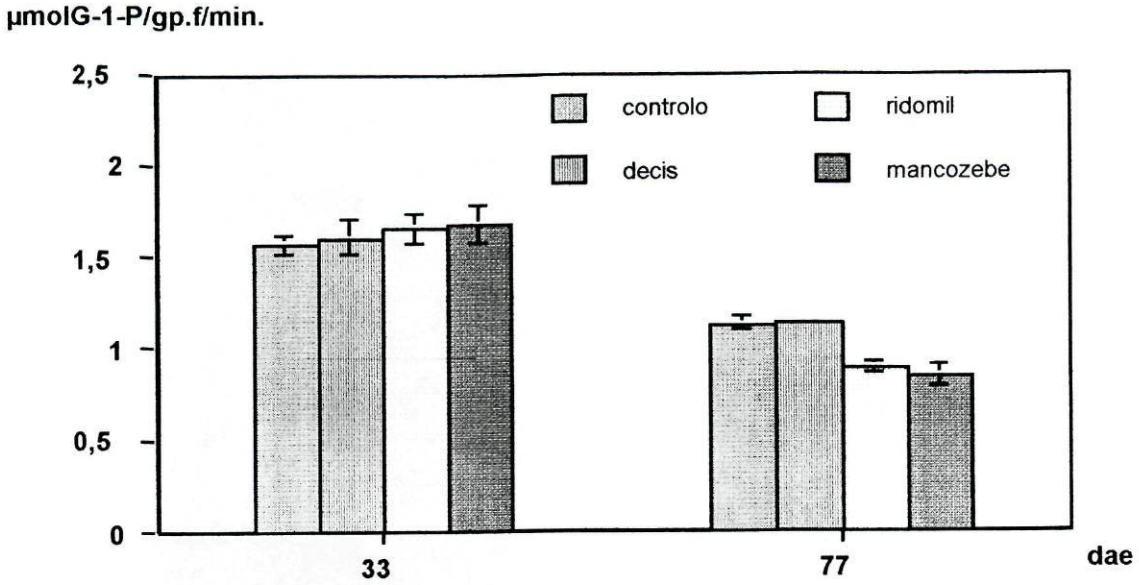


Gráfico 14 - Comportamento da ADP-glucose pirofosforilase em tubérculos colhidos aos 33 dae e 77 dae, nos quatro grupos de plantas. Valores expressos como médias ± E.P.

Nos tubérculos das plantas tratadas com Ridomil ocorria uma diminuição de 21%, enquanto que o Mancozebe provocava um decréscimo de cerca de 25% (Tabela 15 e Gráf. 14).

Em todos os grupos de plantas, aos 77 dae relativamente aos valores encontrados aos 33 dae, ocorreu uma diminuição da actividade da ADP-glucose pirofosforilase, como se pode observar pela análise da Tabela 15 e Gráfico 14.

- Amido

A quantificação bioquímica do amido realizada em tubérculos colhidos aos 33 dae mostrou que o teor deste polissacarídeo era semelhante nos quatro conjuntos de tubérculos (Tabela 16 e Gráf. 15).

Aos 77 dae, embora a representação gráfica dos valores obtidos na quantificação bioquímica torne evidente algumas variações nas quatro situações estudadas (Tabela 16 e Gráf. 15), a análise estatística revelou que essas diferenças não eram significativamente diferentes.

Tabela 16 - Quantidade de amido em tubérculos colhidos aos 33 dae e 77 dae, provenientes de plantas controlo e de plantas tratadas com os agroquímicos.

	Amido (mg glucose/gp.f.)			
	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
33 dae	51,68 ± 3,85^a	49,56 ± 4,61^a	50,48 ± 1,96^a	45,53 ± 4,62^a
77 dae	68,39 ± 4,24^b	73,40 ± 6,58^b	64,07 ± 4,25^b	67,73 ± 3,44^b

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3).

Em cada coluna os valores assinalados por diferentes letras são significativamente diferentes do anterior (P<0,05).

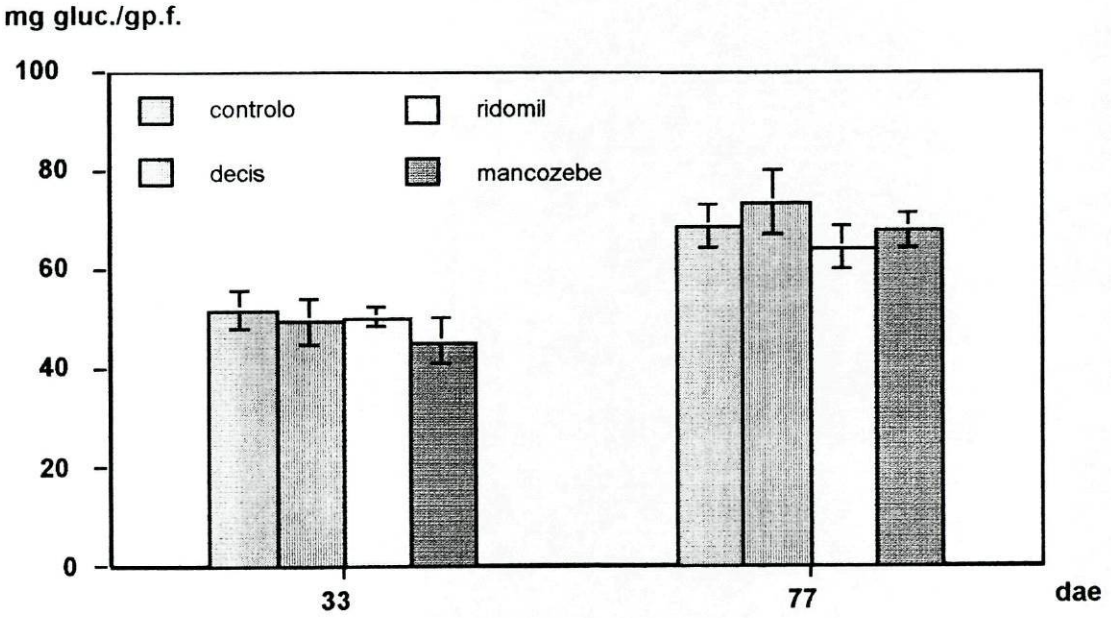


Gráfico 15 - Teor em amido de tubérculos de plantas controlo e tratadas com os agroquímicos. Valores expressos como médias ± E.P.

Como se pode observar pela análise da Tabela 16 e Gráfico 15, o teor em amido aumentou em todos os grupos de tubérculos aos 77 dae em relação aos valores quantificados aos 33 dae.

Determinações bioquímicas realizadas no fim do ciclo cultural

No fim do ciclo de cultura (cerca de 100 dae), os tubérculos foram colhidos e foi feita a avaliação da produtividade. De entre os trubérculos produzidos foram sorteados alguns com 120-130 g de peso fresco e, um diâmetro aproximado de 6,5 cm (Fig. 52C), os quais se usaram para determinações bioquímicas.

Os resultados obtidos para a quantificação do teor em amido, que se encontram descritos na Tabela 17, mostraram que ocorria um aumento deste polissacarídeo nos tubérculos produzidos pelas plantas tratadas com Decis, relativamente ao controlo. Ao contrário, os tubérculos provenientes das plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe mostravam um decréscimo na quantidade de amido; a aplicação de Ridomil às plantas provocou uma diminuição de cerca de 5,7% e o Mancozebe um decréscimo de cerca de 3,3%. Apesar das diferenças encontradas no teor de amido (Tabela 17 e Gráf. 16), o teor em amilose expresso em valor percentual não diferia nos quatro grupos de tubérculos (Tabela 17).

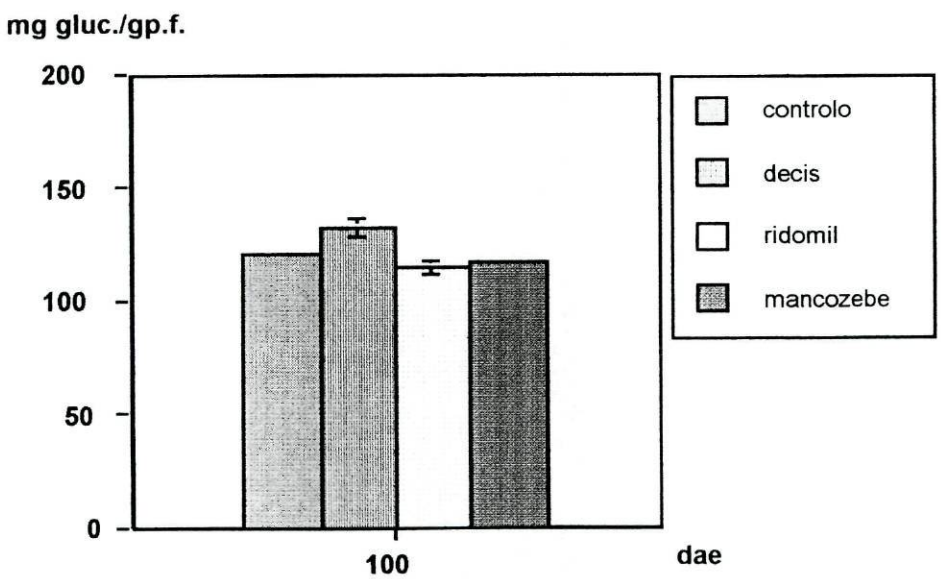


Gráfico 16 - Variação do teor em amido dos tubérculos colhidos no fim do ciclo cultural. Valores expressos como médias ± E.P.

Tabela 17 - Níveis de amido, amilose, proteínas totais e aminoácidos livres quantificados em tubérculos dos quatro grupos de plantas.

	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
Amido (mg/gp.f.)	121,09 ± 0,70	128,25 ± 2,29*	114,18 ± 2,50*	117,05 ± 1,13*
Amilose (%)	23,32 ± 1,09	21,11 ± 0,13	22,12 ± 0,61	22,54 ± 0,45
Proteínas totais (mg/gp.f.)	15,39 ± 0,24	12,84 ± 0,18*	10,57 ± 0,37*	11,27 ± 0,39*
Aminoácidos (mg/gp.f.)	4,07 ± 0,12	5,94 ± 0,34*	4,82 ± 0,11*	4,87 ± 0,12*

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05).

Nos tubérculos produzidos pelas plantas tratadas com Decis surgia um menor teor de proteínas totais (cerca de 16%) e a sua quantidade era ainda menor nos tubérculos produzidos pelas plantas pulverizadas com os dois fungicidas, Ridomil ou Mancozebe, nos quais ocorria uma diminuição de 31% e 27%, respectivamente (Tabela 17 e Gráf. 17). A quantificação dos aminoácidos livres mostrou um padrão de variação inverso ao observado para as proteínas totais. A análise do Gráfico 17 e da Tabela 17, permite verificar que os tubérculos provenientes das plantas tratadas, independentemente do agroquímico aplicado, mostravam níveis de aminoácidos sempre superiores aos dos tubérculos controlo.

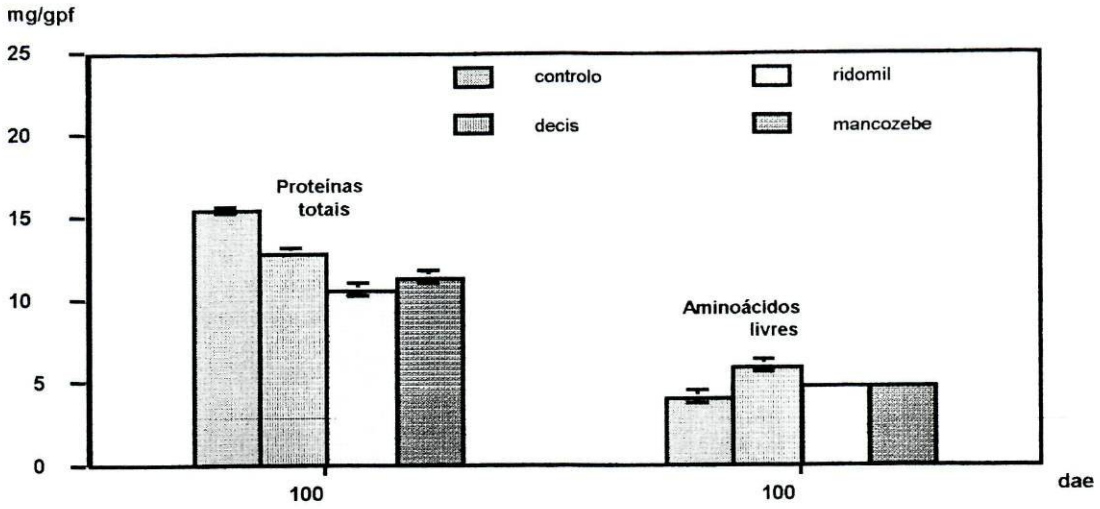


Gráfico 17 - Variação da quantidade de proteínas totais e de aminoácidos livres em tubérculos colhidos aos 100 dae. Valores expressos como médias percentagem ± E.P.

As quantificações de zinco e manganésio mostraram que apenas os tubérculos produzidos pelas plantas tratadas com Ridomil apresentavam níveis de zinco e manganésio superiores aos tubérculos controlo, surgindo o teor de zinco aumentado em cerca de 27% e o manganésio em cerca de 88%. Entre os tubérculos controlo e os provenientes das plantas a que se aplicou Decis ou Mancozebe não foram quantificadas diferenças, quer nos níveis de zinco, quer nos de manganésio (Tabela 18 e Gráf. 18).

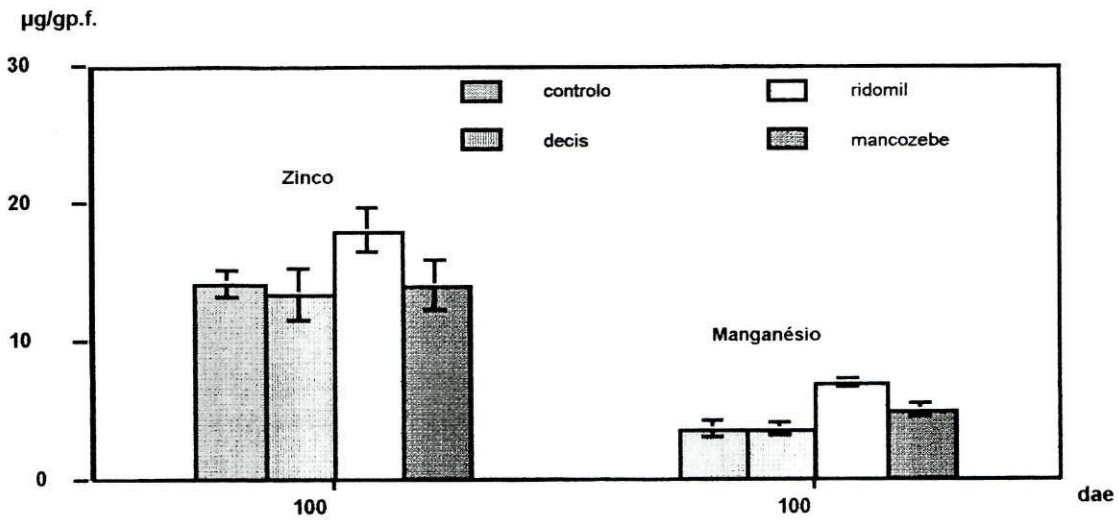


Gráfico 18 - Alterações no teor de zinco e manganésio dos tubérculos. O teor de zinco e manganésio surge significativamente aumentado nos tubérculos produzidos pelas plantas tratadas com Ridomil. Valores expressos como médias ± E.P.

Tabela 18 - Valores obtidos para os níveis de zinco e manganésio em tubérculos provenientes dos quatro grupos de plantas.

	Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
Zinco (µg/gp.s.)	14,15 ± 1,00	13,40 ± 1,90	18,05 ± 1,65*	14,05 ± 1,85
Manganésio (µg/gp.s.)	3,66 ± 0,58	3,57 ± 0,44	6,89 ± 0,31*	4,94 ± 0,48

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3). Em cada linha os valores assinalados com * são significativamente diferentes do da situação controlo (P<0,05)

Gráfico 18 - Alterações no teor de zinco e manganésio dos tubérculos. O teor de zinco e manganésio surge significativamente aumentado nos tubérculos produzidos pelas plantas tratadas com Ridomil. Valores expressos como médias ± E.P.

Produção de tubérculos

A produção de tubérculos foi convertida em toneladas por hectare e os valores obtidos estão descritos na Tabela 19. A produtividade das plantas que foram tratadas com Decis foi superior à das plantas controlo, não se tendo verificado diferença na produção de tubérculos das plantas controlo e das plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe.

Tabela 19 - Produção de tubérculos das plantas controlo e das plantas tratadas com os agroquímicos.

Produtividade (t/ha)			
Controlo	Decis	Ridomil	Mancozebe
29,02	31,67	28,61	29,92

Nota : Durante os anos em que decorreu o trabalho de campo, nem sempre houve coincidência exacta nos dias de tratamentos com os agroquímicos e consequentemente nos dias de colheita de material. No entanto, na descrição dos resultados obtidos, optou-se por referir apenas um conjunto de datas de colheita, para tornar essa descrição menos confusa.

3.3. Estudos em tecido caloso

Cultura estabelecida de tecido caloso

A cultura estabelecida de tecido caloso utilizada neste estudo foi obtida a partir de fragmentos foliares de plantas jovens de *S. tuberosum* L. cv. Désirée. As porções foliares desinfectadas (ver Material e Métodos), eram cultivadas no meio de indução, verificando-se após alguns dias de cultura (16 dias), o aparecimento de tecido caloso nas regiões periféricas dos explantes (Fig. 53). Com a evolução da cultura formavam-se massas de tecido caloso cujo crescimento era mantido por transferência para meio de manutenção. Após o crescimento do tecido, em frascos de cultura, durante cerca de 20-21 dias (Fig. 54) o tecido era subcultivado para meio fresco (Fig. 55). Depois da obtenção de tecido caloso em abundância foi possível iniciar o estudo do efeito do insecticida Decis e posteriormente do fungicida sistémico Ridomil, neste modelo *in vitro*.

O tecido caloso estabelecido apresentava consistência friável e elevado teor hídrico (cerca de 96-97% de água) e, numa fase inicial do trabalho, apresentava cor verde amarelada (Fig. 56). Com o objectivo de obter tecido caloso com um nível superior de clorofilas, foram feitas alterações nas condições de cultura e após algumas repicagens conseguiu-se obter tecido caloso em que, de facto, surgia cor verde (Fig. 57) e, portanto, com teor clorofilino mais elevado.

A concentração de Decis que nos parecia mais adequada utilizar no estudo *in vitro* era a concentração utilizada nos ensaios de campo (0,03% v/v). No entanto, tendo presente as características peculiares do sistema *in vitro* iniciou-se um estudo com diferentes concentrações deste insecticida, incluindo a concentração utilizada nos ensaios de campo, para seleccionar a que parecesse mais aconselhável. Dado que a nível macroscópico o tecido se mostrou insensível à presença do agroquímico, não tendo manifestado qualquer sintoma de fitotoxicidade, optou-se por realizar o estudo *in vitro* usando meio de manutenção contendo Decis com a mesma concentração dos trabalhos de campo, ou seja, 0,03% (v/v).

Figs. 53 a 57 - Tecido caloso de *S. tuberosum* cv. Désirée.

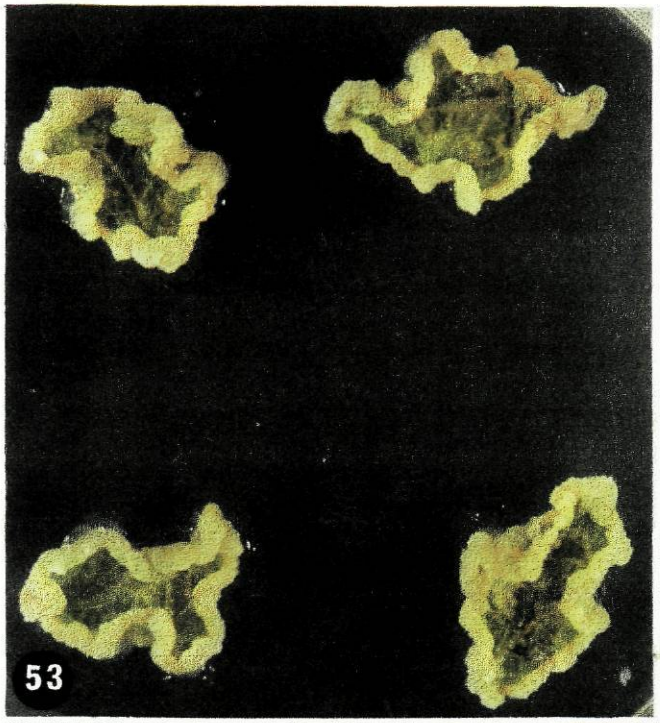
Fig. 53 - Aspecto de explantes foliares ao fim de 16 dias de cultura, em meio de indução, onde se observa tecido caloso nas regiões periféricas dos explantes.

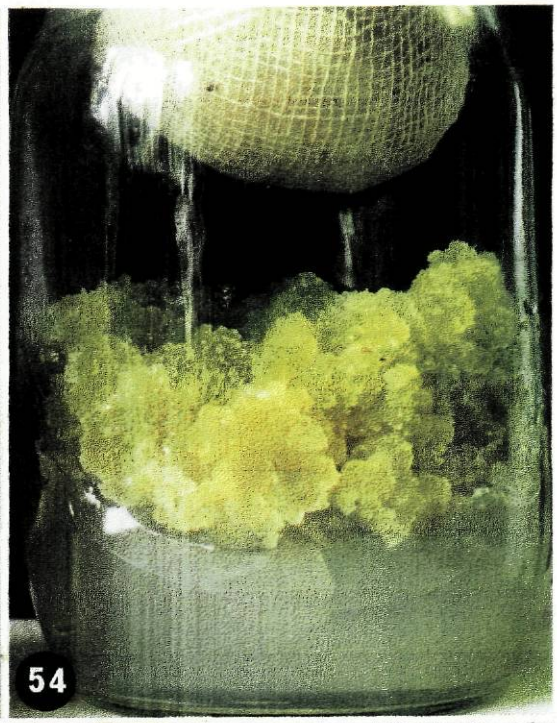
Fig. 54 - Tecido caloso crescido durante 20 dias em meio de manutenção, onde é evidente a cor verde amarelada que o tecido apresenta.

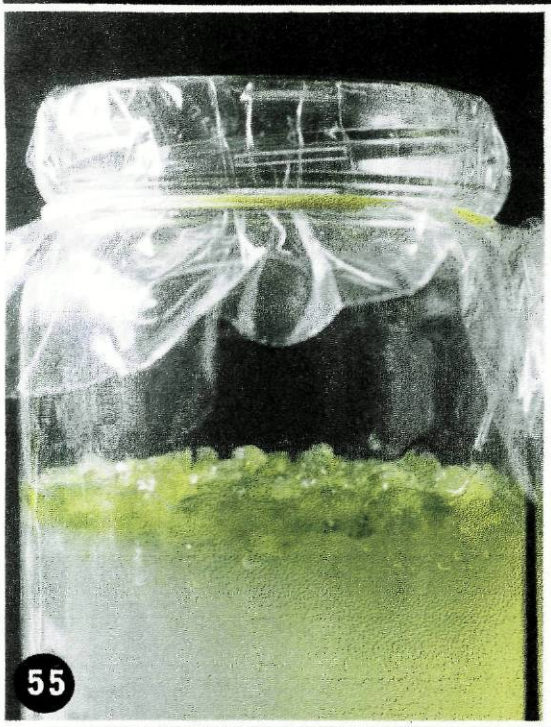
Fig. 55 - Imagem de tecido caloso imediatamente após a subcultura para meio fresco, onde se pode observar uma das alterações nas condições de cultura, concretamente o modo de fechar os frascos; quando comparada esta imagem com a Fig. 54, pode ver-se que em substituição da rolha de algodão e gaze, foi usada uma película transparente apropriada.

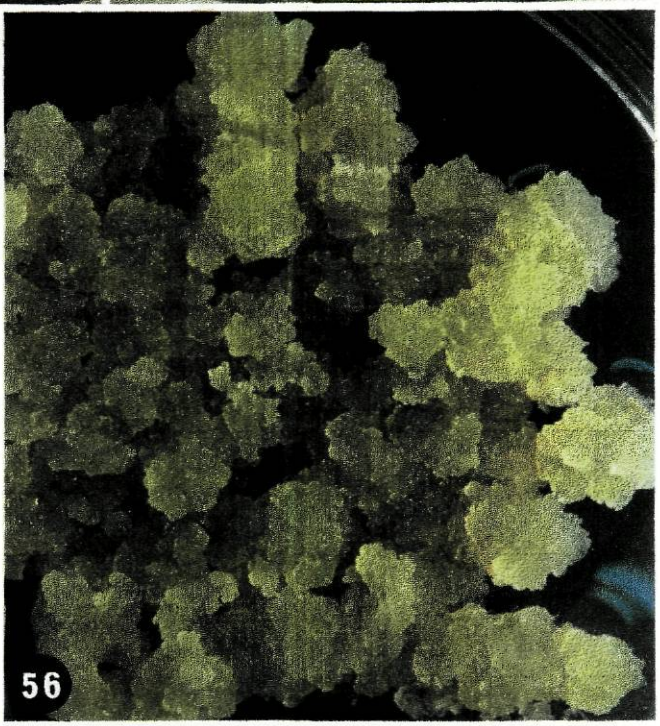
Fig. 56 - Aspecto do tecido caloso mantido em condições semelhantes ao da Fig. 54; notar a cor verde amarelada evidenciada pelo tecido.

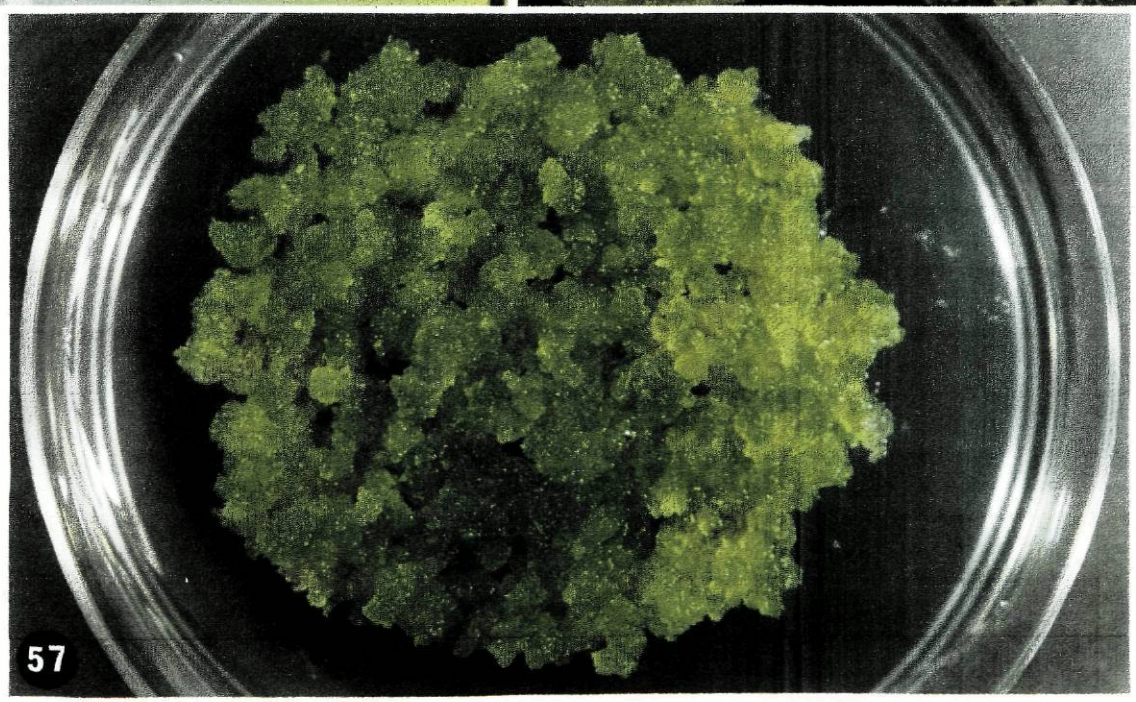
Fig. 57 - Tecido caloso obtido após algumas repicagens, depois de alterações nas condições de cultura; quando comparado este tecido com o ilustrado na Fig. 56, é notória a diferença de cor resultante do diferente teor de clorofilas que possui.


53


54


55


56


57

O estudo da resposta do tecido caloso crescido na presença de Ridomil, foi precedido pela determinação da concentração mínima inibitória (MIC-minimum inhibitory concentration), deste fungicida para *Phytophthora infestans*, pois pretendia-se usar o produto numa concentração capaz de impedir o crescimento do fungo e posteriormente analisar a resposta do tecido vegetal a esta concentração do fungicida. Para tal, foi preparado meio de manutenção ao qual se adicionou o agroquímico em várias concentrações, procedendo-se de seguida à inoculação com o fungo. A concentração mínima inibitória foi encontrada quando se adicionou ao meio o fungicida na concentração de 0,025% (p/v) (Fig. 58).

Após se ter encontrado a concentração de Decis e a de Ridomil a serem utilizadas no estudo *in vitro* e, utilizando a mesma metodologia, tecido caloso foi transferido para meio de cultura contendo Decis (0,03% v/v) ou Ridomil (0,025% p/v), e a resposta do tecido caloso crescido na presença de cada um dos agroquímicos foi avaliada a nível bioquímico e ultraestrutural.

Determinações bioquímicas

- Proteínas

O nível das proteínas solúveis no tecido caloso crescido na presença de Decis após 5 h surgiu aumentado significativamente cerca de 25%, diferença que desapareceu após 24 h (Tabela 20 e Gráf. 19). Ao contrário, os valores encontrados para as proteínas insolúveis eram muito semelhantes no tecido caloso controlo e no tratado, quer após 5 h, quer após 24 h de subcultura (Tabela 20 e Gráf. 20).

O tecido caloso colhido após 14 dias de crescimento mostrava um comportamento diferente (Tabela 20, Gráf. 19 e Gráf. 20). Foram encontrados níveis de proteínas solúveis inferiores aos do tecido controlo, enquanto que ocorria um aumento das proteínas insolúveis. Curiosamente, ao fim destes 14 dias, os níveis de proteínas totais (solúveis + insolúveis) eram semelhantes em ambas as situações.

Fig. 58 - Imagens do crescimento do fungo no meio de manutenção, contendo diferentes concentrações de Ridomil. A mais baixa concentração de fungicida, que inibiu o crescimento do fungo foi de 0,025% (p/v) - placa 6 - sendo esta considerada a concentração mínima inibitória.

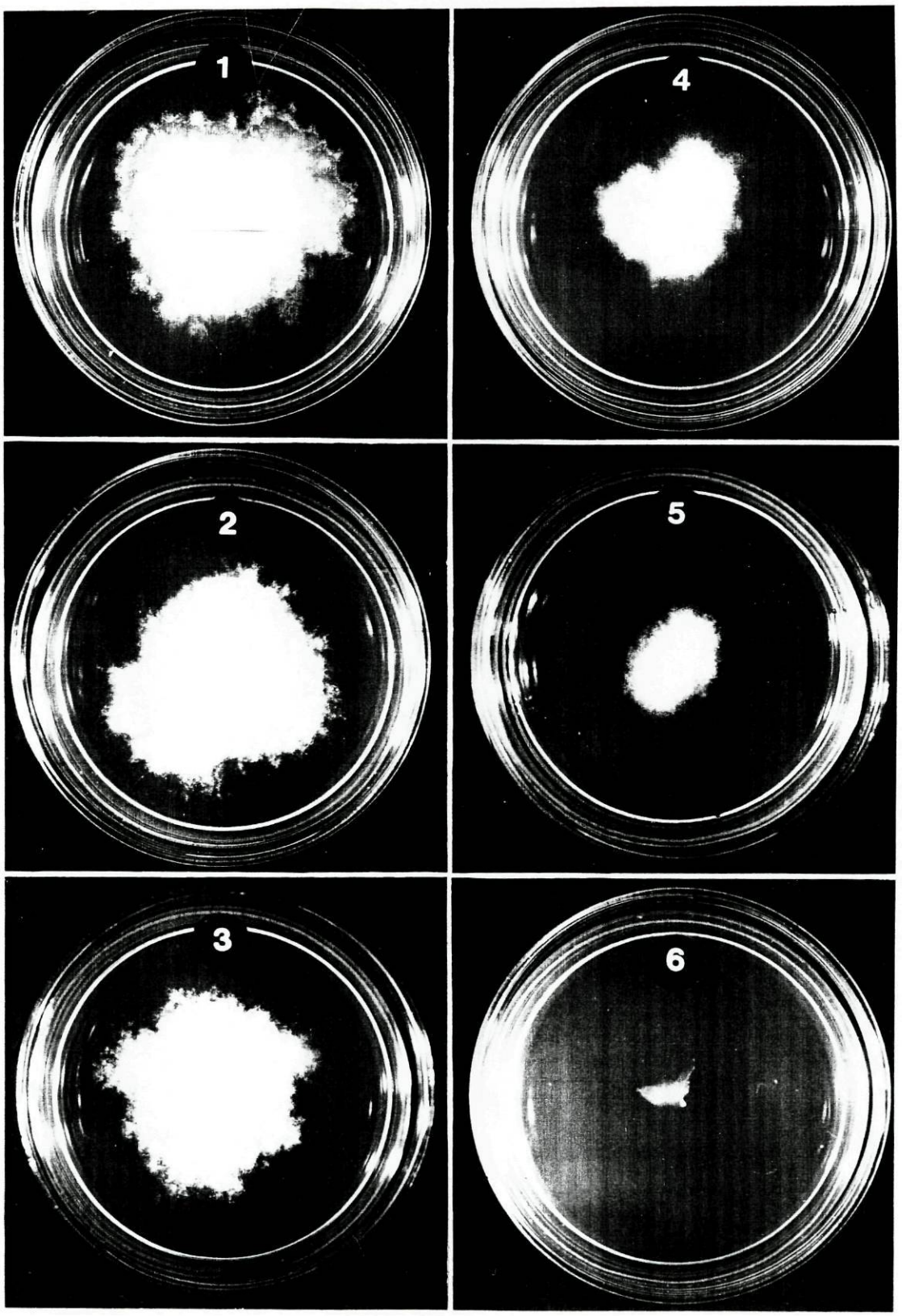

1
4
2
5
3
6

Tabela 20 - Teor de proteínas solúveis e insolúveis em tecido caloso controlo e crescido na presença de Decis, após 5 h, 24 h e 14 dias.

	Proteínas Solúveis (mg/gp.f.)		Proteínas Insolúveis (mg/gp.f.)	
	Controlo	Decis	Controlo	Decis
5 horas	$0,495 \pm 0,002^{a}$	$0,622 \pm 0,018^{b}$	$1,737 \pm 0,032^{c}$	$1,895 \pm 0,053^{c}$
24 horas	$0,693 \pm 0,017^{a}$	$0,694 \pm 0,002^{a}$	$1,915 \pm 0,040^{c}$	$1,973 \pm 0,041^{c}$
14 dias	$1,000 \pm 0,027^{a}$	$0,812 \pm 0,059^{b}$	$1,728 \pm 0,061^{c}$	$1,963 \pm 0,074^{d}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05).

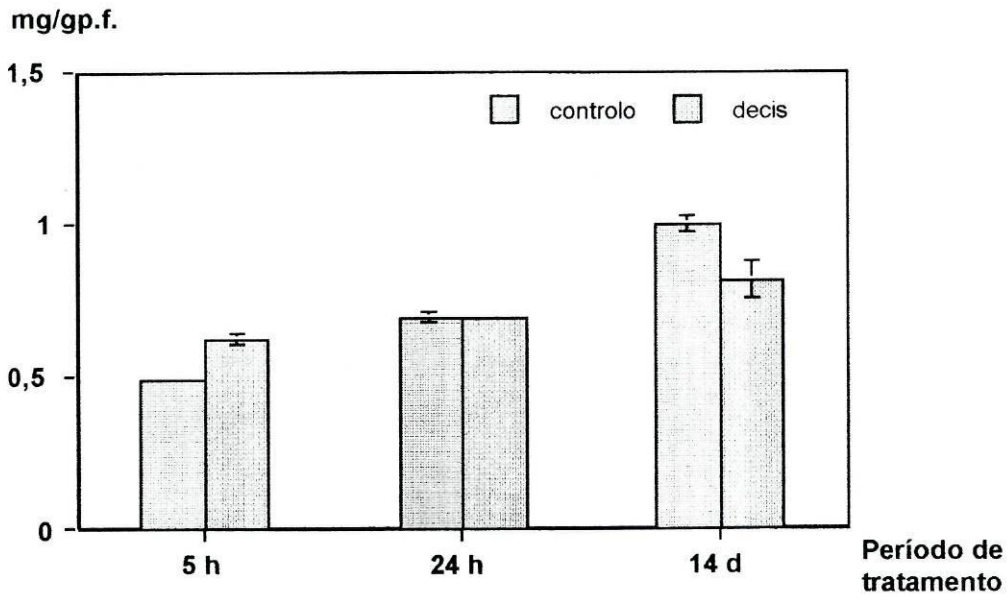


Gráfico 19 - Teor de proteínas solúveis quantificado no tecido caloso controlo e no crescido na presença de Decis, após 5 h, 24 h e 14 dias. Valores expressos como médias ± E.P.

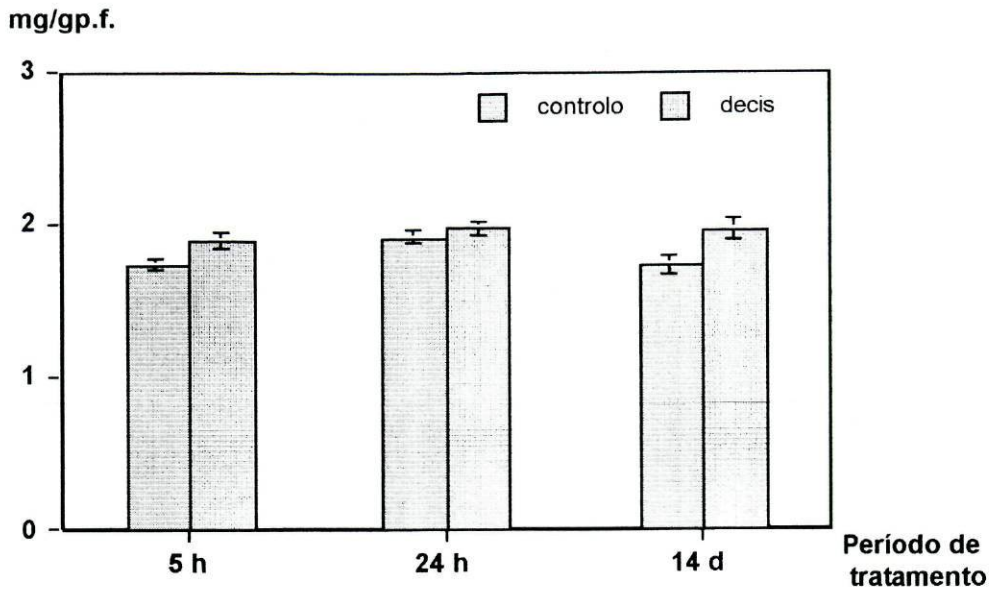


Gráfico 20 - Teor de proteínas insolúveis quantificado no tecido caloso controlo e no crescido na presença de Decis, após 5 h, 24 h e 14 dias. Valores expressos como médias ± E.P.

Apesar das proteínas solúveis surgirem aumentadas no tecido crescido, durante 5 h, na presença de Decis, o padrão electroforético em SDS-PAGE, mostrou que não ocorriam alterações qualitativas, mas apenas algumas diferenças quantitativas. No gel das proteínas solúveis quatro bandas polipeptídicas com massas moleculares de cerca de 147, 113, 87 e 55 kDa, respectivamente, apareciam mais intensamente coradas (Fig. 59 - comparar coluna 1 com coluna 2). Ao contrário, o gel das proteínas insolúveis não mostrava diferenças no padrão electroforético, relativamente à situação controlo. Por sua vez, nos geles, quer das proteínas solúveis, quer das insolúveis, após 24 h de subcultura, não ocorriam diferenças nos padrões electroforéticos entre o tecido controlo e o tratado.

Os padrões electroforéticos após 14 dias de crescimento mostraram apenas diferenças quantitativas (Fig. 59). De facto, no gel das proteínas solúveis do tecido caloso controlo algumas bandas de polipeptídeos surgiam mais intensamente coradas (comparar coluna 3 com coluna 4); para além de duas bandas com massas moleculares de cerca de 149 e 109 kDa, apareciam quatro bandas entre 92-66 kDa, três bandas entre 64-50 kDa e quatro bandas com massa molecular entre 46-43 kDa. Ao contrário, no gel das proteínas

insolúveis, era no tecido crescido na presença do insecticida, que alguns polipeptídeos apareciam mais intensamente corados, do que os correspondentes no material controlo (Fig. 59 - comparar coluna 5 com coluna 6).

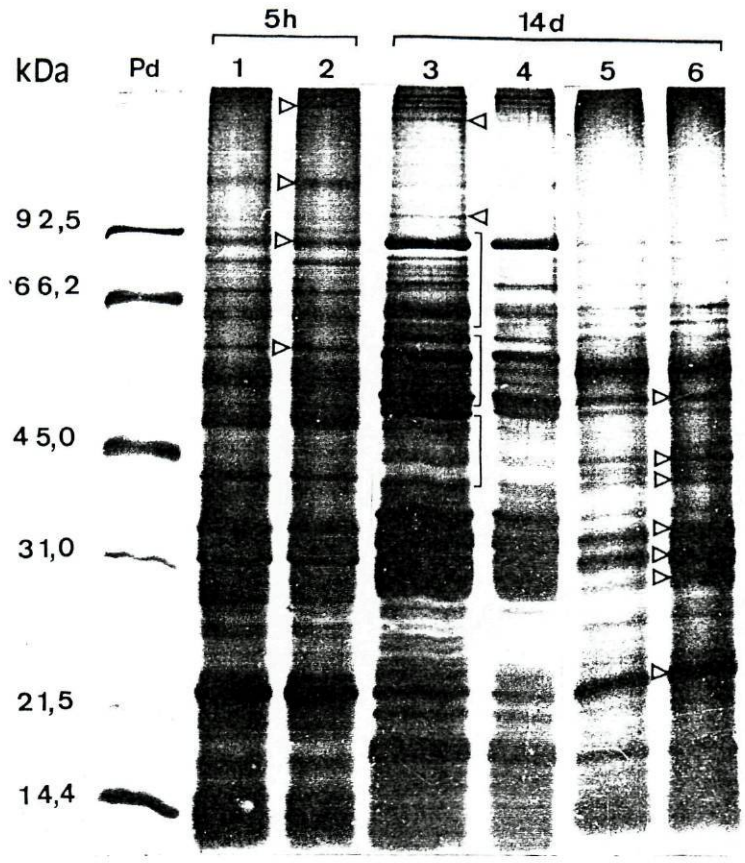
Quando o tecido caloso crescia na presença do Ridomil, durante períodos curtos, ou seja 5 e 24 h, a quantidade de proteínas solúveis, surgia mais elevada cerca de 19% após 5 h, diferença que desaparecia após 24 h (Tabela 21 e Gráf. 21).

O nível das proteínas insolúveis, após 5 h, era semelhante nas duas situações (Tabela 21 e Gráf. 22) e, ao contrário, após 24 h de subcultura, o tratamento provocava uma diminuição significativa de cerca de 13%.

Tabela 21 - Teor de proteínas solúveis e insolúveis em tecido caloso controlo e crescido na presença de Ridomil, após 5 h, 24 h e 14 dias.

	Proteínas Solúveis (mg/gp.f.)		Proteínas Insolúveis (mg/gp.f.)	
	Controlo	Ridomil	Controlo	Ridomil
5 h	$0,861 \pm 0,020^{a}$	$1,027 \pm 0,058^{b}$	$1,680 \pm 0,070^{c}$	$1,756 \pm 0,038^{c}$
24 h	$0,951 \pm 0,034^{a}$	$0,976 \pm 0,032^{a}$	$2,021 \pm 0,076^{c}$	$1,753 \pm 0,042^{d}$
14 d	$1,187 \pm 0,042^{a}$	$1,325 \pm 0,031^{b}$	$2,231 \pm 0,011^{c}$	$2,420 \pm 0,086^{c}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada linha os valores assinalados com diferentes expoentes são significativamente diferentes ($P<0,05$).



59

Fig. 59 - SDS-PAGE. Colunas 1 e 2 - proteínas solúveis do tecido caloso controlo e do crescido na presença de Decis, durante 5 h. Colunas 3 a 6 - proteínas extraídas após 14 dias de crescimento; colunas 3 e 4 - proteínas solúveis do tecido caloso controlo e do tratado, respectivamente; colunas 5 e 6 - proteínas insolúveis do tecido caloso controlo e tratado, respectivamente. É bem evidente que várias bandas polipeptídicas surgem com uma diferente intensidade de coloração, o que mostra a ocorrência de diferenças quantitativas entre o tecido controlo e o crescido na presença de Decis. Pd - padrões proteicos.

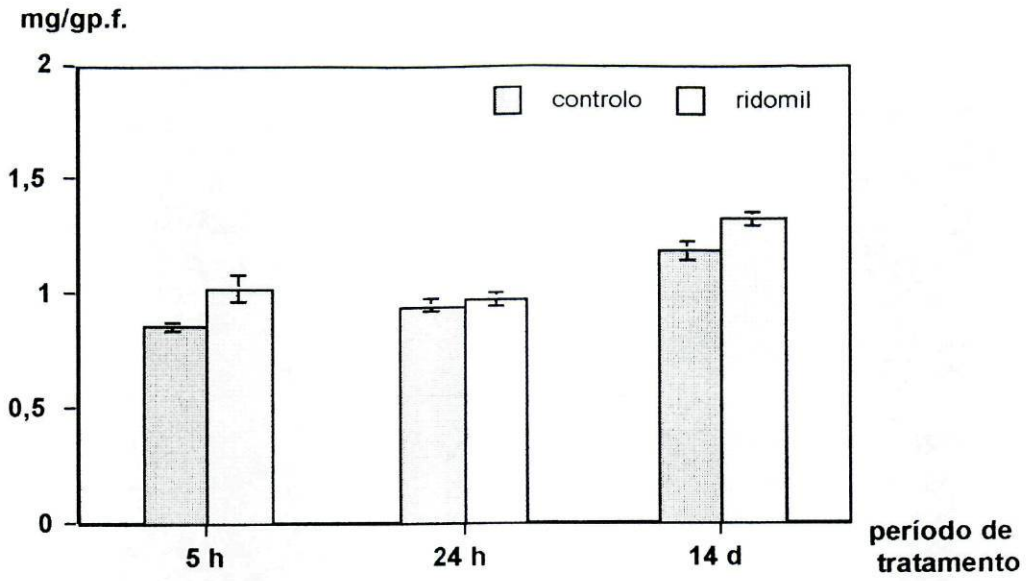


Gráfico 21 - Teor de proteínas solúveis quantificado no tecido caloso controlo e no crescido na presença de Ridomil, após 5 h, 24 h e 14 dias. Valores expressos como médias ± E.P.

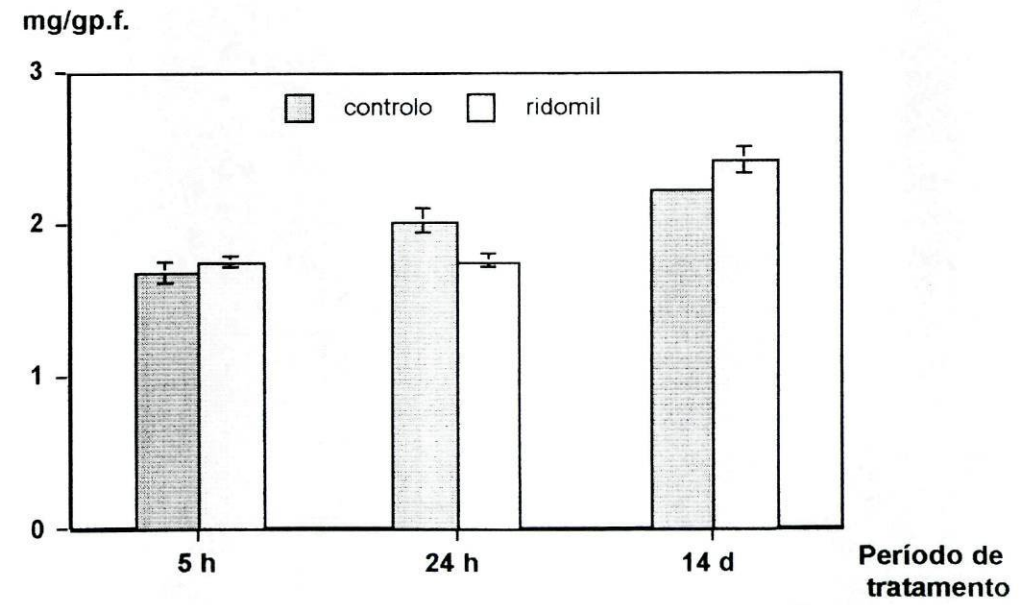
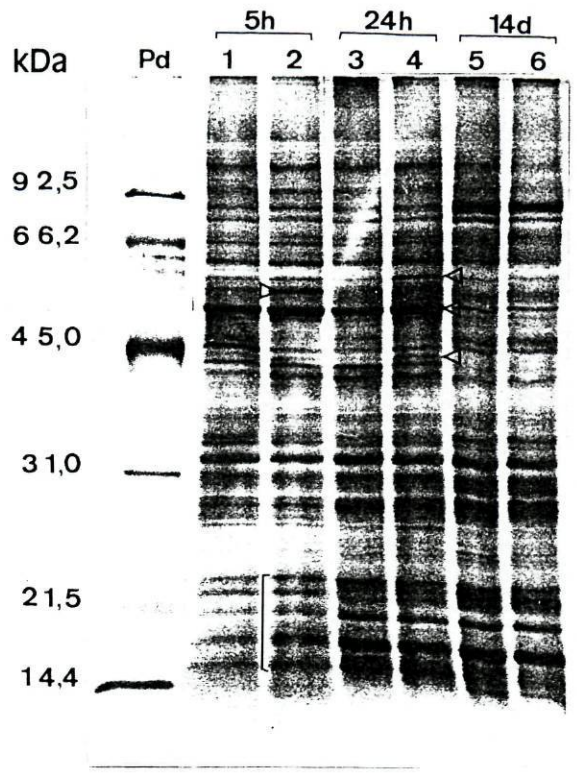


Gráfico 22 - Teor de proteínas insolúveis quantificado no tecido caloso controlo e no crescido na presença de Ridomil, após 5 h, 24 h e 14 dias. Valores expressos como médias ± E.P.

O tecido caloso crescido na presença do Ridomil durante um período mais longo (14 dias) mostrava que, de um modo semelhante ao observado após 5 h, o fungicida induzia um aumento significativo de cerca de 11% no teor de proteínas solúveis (Tabela 21 e Gráf. 21). O padrão de variação das proteínas insolúveis, após 14 dias, era também semelhante ao observado após 5 h, não se encontrando diferenças significativas entre a situação controlo e o tecido crescido na presença do fungicida (Tabela 21 e Gráf. 22).

Apesar de ocorrerem algumas diferenças no teor das proteínas solúveis, os padrões electroforéticos mostraram que não existiam novas bandas polipeptídicas, sendo apenas perceptíveis algumas alterações quantitativas. Assim, no gel das proteínas solúveis extraídas após 5 h de crescimento, surgiram algumas bandas de polipeptídeos mais intensamente coradas; uma banda polipeptídica de 52 kDa e algumas bandas com massas moleculares entre 24 e 15 kDa (Fig. 60 - comparar coluna 1 com coluna 2). Diferenças quantitativas foram também encontradas após 24 h de crescimento, surgindo no padrão electroforético das proteínas solúveis três bandas com massas moleculares de 55, 49 e 44 kDa mais coradas no material tratado do que as correspondentes no tecido controlo (Fig. 60 - comparar coluna 3 com coluna 4). Ao fim de 14 dias, embora as determinações bioquímicas revelassem a ocorrência de um teor proteico mais elevado no tecido caloso crescido na presença de Ridomil do que no controlo, nos respectivos padrões electroforéticos não se encontraram diferenças.

Os padrões electroforéticos das proteínas insolúveis do tecido caloso crescido com Ridomil, quer após períodos curtos (5 h e 24 h), quer após períodos longos (14 dias), mostravam que não surgiam diferenças relativamente à situação controlo, apesar de a nível bioquímico, às 24 h, terem sido quantificados diferentes teores de proteínas insolúveis (Tabela 21 e Gráf. 22).



60

Fig. 60 - SDS-PAGE das proteínas solúveis do tecido caloso controlo e crescido na presença de Ridomil, durante 5 h (colunas 1 e 2), 24 h (colunas 3 e 4) e 14 dias (colunas 5 e 6). Após 5 h de crescimento algumas bandas polipeptídicas surgem mais intensamente coradas no tecido caloso tratado e, após 24 h, três bandas com massas moleculares de cerca de 55, 49 e 47 kDa aparecem mais coradas (assinaladas com ▷) que as correspondentes no tecido controlo. Pd - padrões proteicos.

- Clorofilas

O teor de clorofilas (a+b) quantificado após 14 dias de crescimento era superior cerca de 79% no tecido caloso crescido na presença de Decis; apesar da diferença observada, a razão clorofila a/clorofila b não surgia alterada nas duas situações estudadas (Tabela 22).

A presença de Ridomil no meio de cultura não provocava variação no teor de clorofilas (Tabela 22), embora o teor de clorofila b surgisse afectado negativamente no tecido tratado provocando alteração da relação clorofila a/b.

Tabela 22 - Teor de clorofilas a+b em tecido caloso controlo e crescido na presença de Decis ou Ridomil, durante 14 dias.

Clorofilas a+b (nmol/gp.f.)			
Controlo	Decis	Controlo*	Ridomil
$8,55 \pm 0,25^{a}$	$15,39 \pm 1,12^{b}$	$48,39 \pm 0,09^{c}$	$45,85 \pm 1,05^{c}$

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3). Em cada linha os valores assinalados com diferentes expoentes são significativamente diferentes ($P<0,05$).

- Nitrato Redutase (NR; EC 1.6.6.1) e Nitrito Redutase (NiR; EC 1.7.7.1)

A actividade das enzimas NR e NiR, envolvidas na redução sequencial do NO_3^- a NO_2^- ,e deste a NH_4^+ foi apreciada no tecido caloso crescido durante 14 dias em meio de cultura contendo Decis ou Ridomil. A actividade da NR surgia aumentada cerca de 11% no tecido caloso crescido na presença de Decis, enquanto que a presença do Ridomil, não afectava a actividade desta enzima (Tabela 23).

O comportamento da enzima nitrito redutase foi semelhante ao observado para a NR. A presença de Decis provocou um aumento da actividade da NiR, registando-se uma diferença da ordem dos 21% relativamente ao tecido controlo (Tabela 23). No tecido crescido no meio suplementado com Ridomil, o valor da actividade da NiR, era semelhante à do tecido caloso controlo.

Tabela 23 - Actividade da nitrato redutase (pkat NO_2^-/gp.f.) e da nitrito redutase (nkat NO_2^- red./gp.f.) no tecido caloso controlo e crescido na presença de Decis ou de Ridomil, durante 14 dias.

	Controlo	Decis	Ridomil
NR (pkat/gp.f.)	21,307 ± 0,487^a	23,655 ± 0,525^b	21,800 ± 0,360^a
NiR (nkat /gp.f.)	3,126 ± 0,113^a	3,606 ± 0,111^b	3,233 ± 0,029^a

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3). Em cada linha os valores assinalados com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05).

Observações ultraestruturais

A organização geral das células do tecido caloso crescido na presença do insecticida Decis era semelhante à das células do tecido caloso controlo. Em ambas as situações podiam observar-se células volumosas do tipo parenquimatoso, muito vacuolizadas, com o citoplasma a ocupar uma estreita faixa adjacente à parede celular; outro tipo de células presentes, semelhantes no aspecto a células meristemáticas, eram de menores dimensões e apresentavam o citoplasma mais denso.

Apesar da organização geral das células nas duas situações (tecido controlo e tratado) ser basicamente a mesma, o estudo ultraestrutural mostrou a ocorrência de algumas alterações nas células do tecido crescido na presença do insecticida. Em particular, os plastídios apareciam mais diferenciados do que no tecido controlo, com um sistema membranoso mais desenvolvido e grãos de amido menos volumosos (comparar Fig. 61 com Fig. 63). No citoplasma, quer do tecido controlo, quer do tecido tratado, eram visíveis numerosos ribossomas, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e dictiossomas (Figs. 61 e 63). Uma outra alteração ultraestrutural detectada no material tratado era a existência de numerosas vesículas associadas com os dictiossomas (comparar Fig. 62 com Fig. 65).

Figs. 61 e 62 - Tecido caloso controlo.

Fig. 61 - Porção de uma célula onde se pode observar várias estruturas celulares. O plastídio apresenta um nível de organização com um sistema lamelar reduzido e grãos de amido volumosos (A) e alguns plastoglóbulos. As mitocôndrias (M) apresentam matriz normal e regular distribuição das cristas. No citoplasma surgem porções de retículo endoplasmático (RE) a cujas membranas, por vezes, estão associados ribossomas. V - vacúolo. 27 000 x.

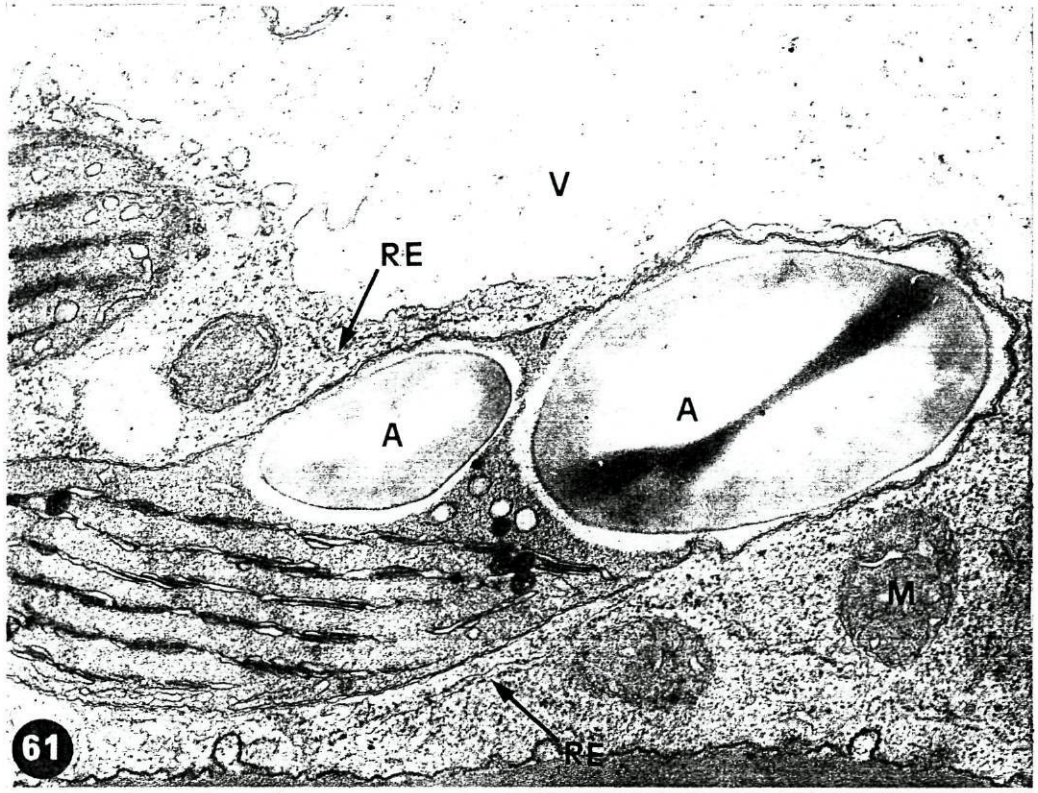
Fig. 62 - Pormenor de uma célula para mostrar dictiossoma com algumas vesículas associadas. 44 000 x.

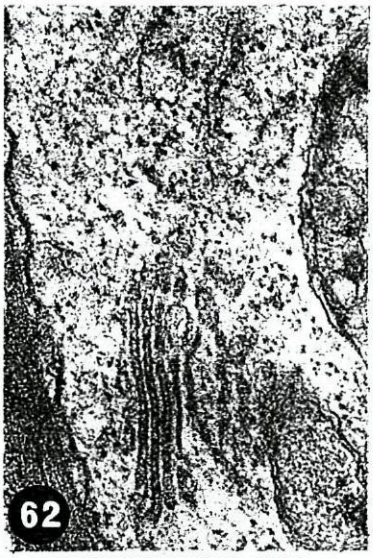
Figs. 63 a 65 - Tecido caloso crescido na presença de Decis.

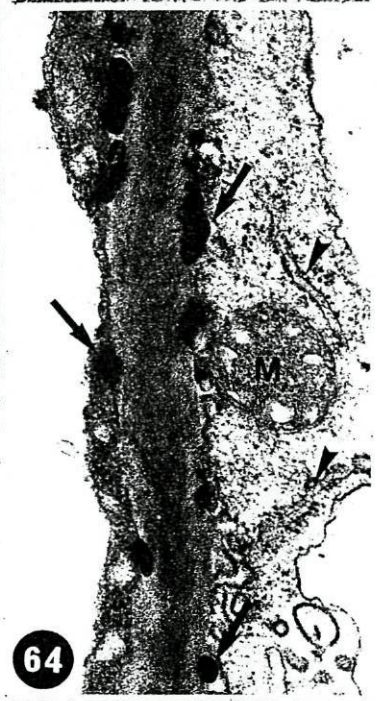
Fig. 63 - Porção de células vacuolizadas, podendo observar-se numa delas dictiossoma (D), cisternas de retículo endoplasmático (RE), plastídio com amido (A) e grana desenvolvido (seta). Nos plastídios surgem com frequência grana com vários tilacóides, como ilustrado no "encaixe". No citoplasma de ambas as células, nas várias cisternas de retículo endoplasmático (RE) distinguem-se, por vezes, ribossomas associados (setas pequenas). As mitocôndrias (M) apresentam aspecto normal. V- vacúolo; PC - parede celular. 21 900 x. "Encaixe" - 92 000 x.

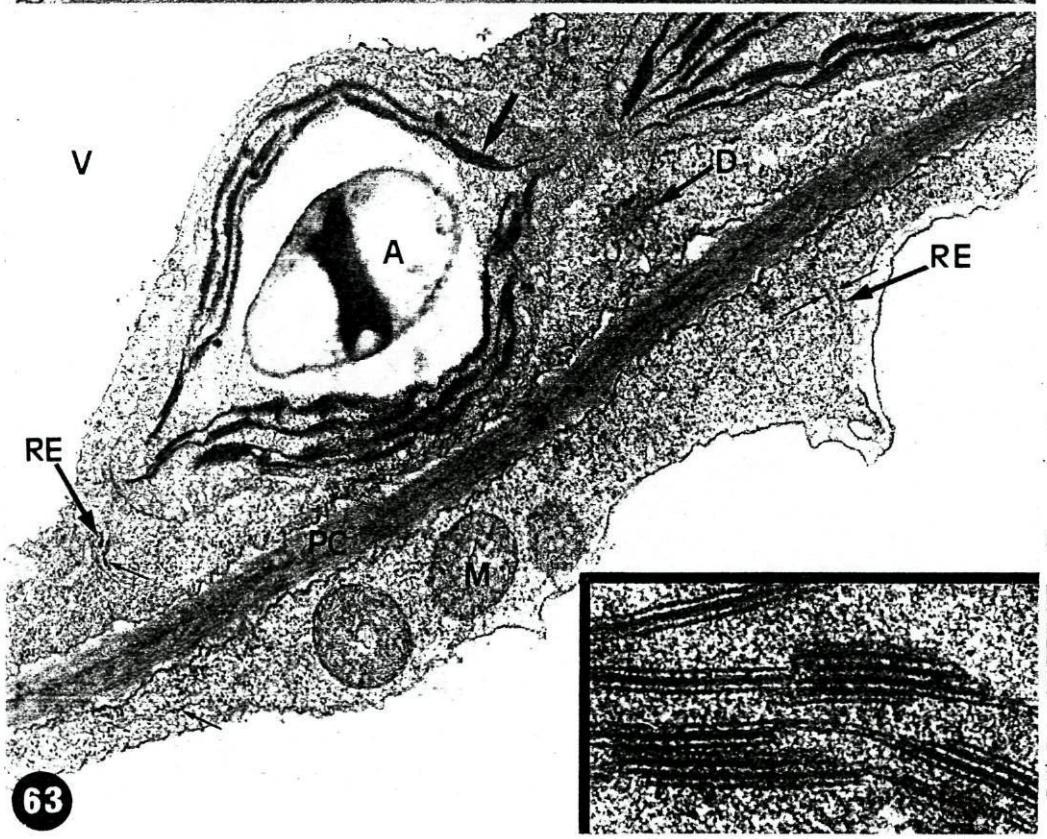
Fig. 64 - Detalhe que mostra material electronodenso (setas), localizado no espaço entre o plasmalema e a parede celular, mitocôndria (M) e perfis de retículo endoplasmático rugoso (pontas de setas). 30 600 x.

Fig. 65 - Imagem de dictiossoma mostrando várias vesículas, onde se podem observar algumas delas revestidas (setas). 62 400 x.


V
RE
A
A
M
RE
61


62


M
64


V
D
A
RE
RE
PC
M
63

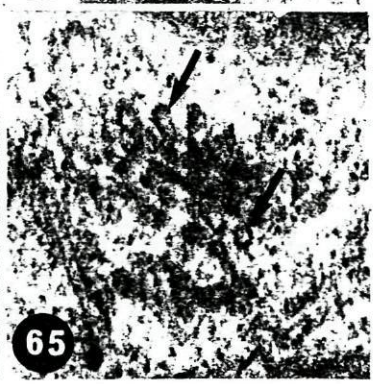
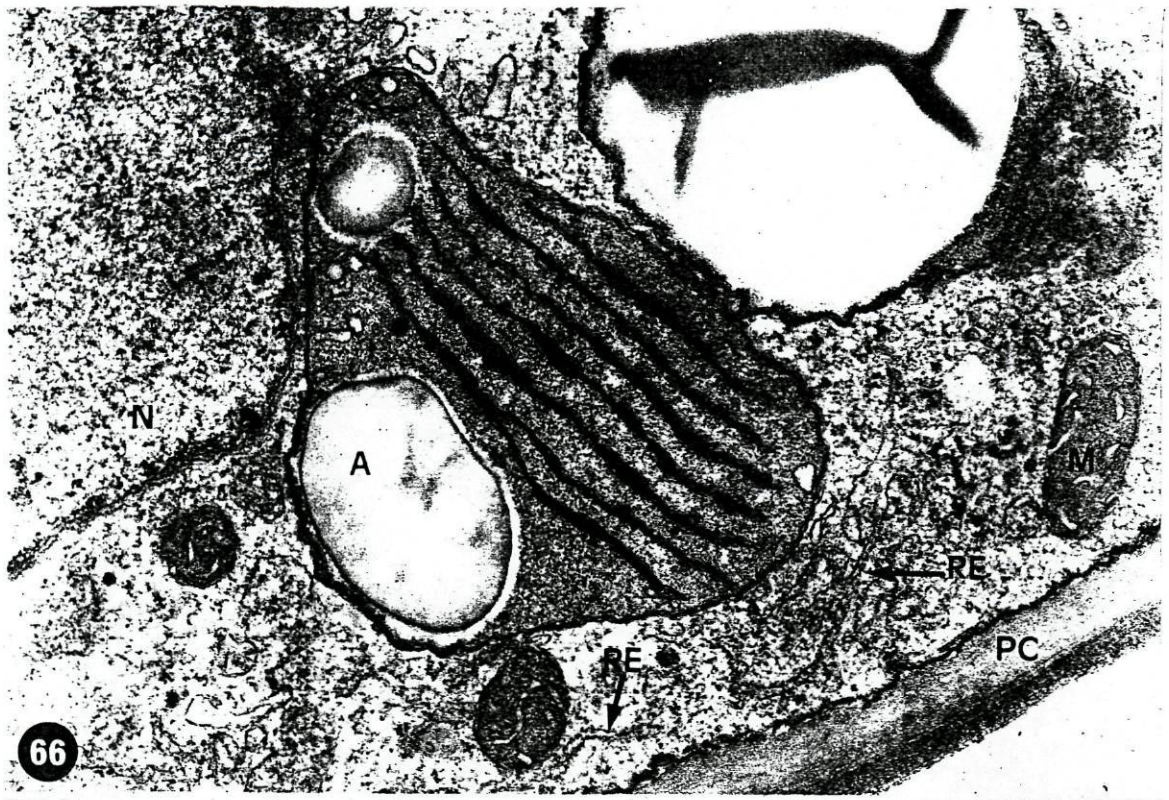

65

Fig. 66 - Tecido caloso controlo.
Porção de uma célula na qual se vê parte do núcleo (N) e plastídio com sistema lamelar pouco desenvolvido e grãos de amido (A). As mitocôndrias (M) surgem com aspecto normal e as longas cisternas de retículo endoplasmático (RE) raramente possuem ribossomas associados. PC - parede celular. 26 250 x.

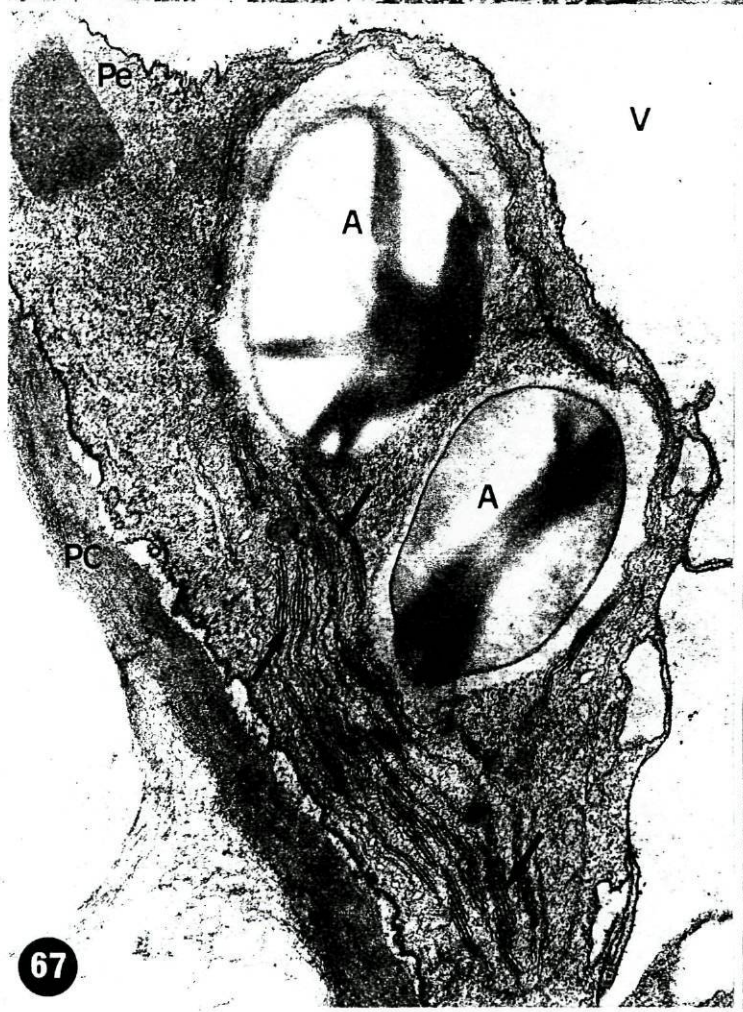
Figs. 67 e 68 - Tecido caloso crescido na presença de Ridomil.

Fig. 67 - Plastídio onde se pode observar o sistema membranoso com um grau de organização ligeiramente superior ao do dos plastídios do tecido caloso controlo, surgindo grana com vários tilacóides (setas), possuindo também amido (A). No peroxissoma (Pe) distingue-se inclusão paracristalina. V- vacúolo; PC - parede celular. 23 750 x.

Fig. 68 - Pormenor de uma célula mostrando cisternas de retículo endoplasmático (setas), que com muita frequência possuem ribossomas associados. Nesta imagem pode ver-se também peroxissoma (Pe) com inclusão paracristalina e mitocôndria (M) evidenciando diminuição da densidade da matriz e redução das cristas mitocondriais (comparar com Fig. 66). 41 600 x.



66



67



68

Algumas destas vesículas eram do tipo revestido, embora a análise de numerosas imagens ultraestruturais sugerisse não se tratar do tipo revestido com clatrina (Fig. 65). No mesmo tecido observava-se frequentemente material denso em electrões, localizado preferencialmente no citoplasma e no espaço entre o plasmalema e a parede celular, como está ilustrado na Fig. 64.

O estudo por microscopia electrónica do tecido caloso tratado com Ridomil, mostrou que o fungicida não provocava alteração profunda da ultraestrutura geral das células. No entanto, a nível das estruturas celulares, surgiam algumas diferenças a nível dos plastídios, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Os plastídios apresentavam um sistema membranoso com um grau de organização ligeiramente superior ao dos do tecido controlo, com grana possuindo um maior número de compartimentos (comparar Fig. 66 com Fig. 67). As mitocôndrias surgiam afectadas, apresentando um menor número de cristas e matriz menos densa, em comparação com as do tecido caloso controlo (comparar Fig. 66 com Fig. 68). A nível do retículo endoplasmático observava-se uma maior abundância dos seus perfis com ribossomas associados (Fig. 68).

4. DISCUSSÃO

4.1. Estudos em folhas

Na globalidade, a análise dos resultados permitiu verificar que os agroquímicos aplicados a batateiras crescidas no campo interferem com a fisiologia destas plantas.

As alterações provocadas pelo Decis, nos vários parâmetros fisiológicos estudados, levam-nos a interpretar o seu efeito principalmente em termos de um atraso da senescência das plantas. Ao contrário, o conjunto de resultados obtidos nas plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe, sugerem que a senescência foliar foi acelerada, observando-se para os dois fungicidas um padrão de processos degenerativos semelhante que, se iniciaram precocemente, em relação às plantas testemunho.

Nas plantas tratadas com Decis, a actividade da RuBisCo mantinha um nível constante após cada tratamento. A actividade da RuBisCo encontrada nestas plantas, mesmo após a última colheita, bem como o teor mais elevado de clorofilas é consistente com a observação macroscópica de ausência mais prolongada de sintomas vísiveis de senescência, portanto nestas plantas a senescência foliar era retardada. A senescência das folhas está normalmente associada com a diminuição da capacidade fotossintética e da actividade da RuBisCo (Jiang *et al.*, 1993), existindo em geral uma correlação positiva

entre o decréscimo da actividade desta enzima e a diminuição das clorofilas (Camp *et al.*, 1982; Secor *et al.*, 1984; Feller & Fischer, 1994). No entanto, embora este decréscimo da actividade da RuBisCo possa ocorrer em paralelo com a degradação das clorofilas, pode não ser um processo sincronizado obrigatoriamente com a mobilização das proteínas (Stoddart & Thomas, 1982). Nas plantas tratadas com Decis, bem como no controlo, o decréscimo das clorofilas não ocorreu simultaneamente com a diminuição da actividade da RuBisCo, resultados concordante com os observados por Friedrich & Huffaker (1980), que sugerem que a perda das clorofilas é uma alteração secundária no metabolismo, durante a senescência foliar.

Durante a senescência a clorofila é catabolizada e, o amarelecimento das folhas é o sintoma mais vísivel a nível macroscópico da sua senescência. No entanto, o mecanismo bioquímico responsável pela dissociação do anel de porfirina da clorofila e, por conseguinte, o amarelecimento das folhas senescentes, constitui ainda um "enigma biológico" (Hendry *et al.*, 1987), admitindo-se, geralmente, que o primeiro passo do catabolismo da clorofila envolve a remoção do grupo fitol pela clorofilase, o que ocorre quando os pigmentos estão ainda complexados com as proteínas (Feller & Fischer, 1994).

A não simultaneidade da diminuição das clorofilas com o decréscimo da actividade da RuBisCo também se verificou nas plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe. Nestes dois grupos de plantas, logo após o 1º tratamento, a actividade desta enzima surgia significativamente inferior ao controlo, situação que se mantinha com os tratamentos subsequentes, enquanto que o teor clorofilino não variava inicialmente (24 dae). Este comportamento poderá ser explicado admitindo que a clorofila pode estar temporariamente protegida da hidrólise, devido à sua associação com as membranas dos tilacóides como foi sugerido por Friedrich & Huffaker (1980), ao estudarem o processo de senescência em folhas de *Hordeum vulgare* L.. Ulteriormente (aos 41 e 55 dae), nestes dois grupos de plantas, ocorria um comportamento paralelo entre a actividade da RuBisCo e o teor clorofilino. Na última colheita de material (67 dae) o teor de clorofilas era inferior ao controlo e a actividade da RuBisCo não surgia afectada, embora fosse cerca de 40% inferior à da

colheita anterior (55 dae), resultados que estão concordantes com os sintomas de senescência, que surgiam mais pronunciados do que nas plantas testemunho.

A aplicação de metalaxil (um dos dois constituintes do Ridomil), a plântulas de citrinos, provocava amarelecimento interfascicular das folhas mais jovens, que se tornavam cloróticas quase na sua totalidade, o que mostra que este fungicida sistémico é fitotóxico (Singh & Mersie, 1993). Estes sintomas relacionados com alterações nos níveis de clorofilas, apesar de mostrarem algum paralelismo com os manifestados pelas plantas de batateira parecem ainda mais drásticos, o que pode ser devido ou à diferente sensibilidade das plantas ou à diferente concentração utilizada. O diferente comportamento das plantas poderá ser devido ao facto das plantas de batateira terem sido pulverizadas com uma combinação mista de metalaxil com mancozebe, enquanto que no trabalho de Singh & Mersie (1993) o metalaxil foi utilizado isoladamente e foi aplicado ao solo.

Quando a actividade da RuBisCo era expressa por mg de clorofilas a+b, o padrão de variação da enzima surgia alterado, quer nas plantas tratadas com Decis, quer nas tratadas com Mancozebe. Nas primeiras plantas, dado possuirem nível de clorofilas superior ao controlo, a actividade da RuBisCo surgia semelhante às plantas testemunhlo. Nas plantas tratadas com Mancozebe (41 e 55 dae), devido ao seu baixo teor clorofilino a actividade da RuBisCo aproximava-se da das plantas controlo. Nas plantas tratadas com Ridomil o comportamento da RuBisCo não surgia alterado, exprimindo a actividade desta enzima por g de peso fresco ou por mg de clorofilas a+b. Isto mostra não ser indiferente o modo com se exprimem os resultados, portanto deve-se ter em atenção a maneira de os representar. Em situações de estudo comparativo de parâmetros expressos com base num determinado parâmetro de referência, que também ele mostre flutuações entre as populações em apreço, parece ser vantajoso expressá-los relativamente a outro cuja oscilação seja menos acentuada, no caso presente, o peso fresco de folha.

É possível admitir-se que os fungicidas ou produtos resultantes das sua decomposição (Cole & Owen, 1987; Lehotay & Kisová, 1993) possam provocar alterações na enzima RuBisCo, semelhantes às que ocorrem com o decorrer do ciclo de vida da planta, mas precocemente. Os efeitos observados no comportamento da RuBisCo podem surgir como

consequência de alteração na quantidade e/ou no estado da sua activação e vários mecanismos podem ser considerados para explicar o decréscimo acelerado na actividade da RuBisCo nestes dois grupos de plantas.

A RuBisCo é uma enzima muito rica em grupos sulfidrilo (SH) (Takabe & Akazawa, 1975) possuindo aproximadamente 96 grupos SH por molécula (Shinozaki & Sugiura, 1982). Os grupos sulfidrilo são vulneráveis à oxidação (Levitt, 1962) e podem ser um dos alvos de ataque dos fungicidas. Como se sabe que o Mancozebe ou os seus metabolitos, interferem com os grupos SH (Corbett *et al.*, 1984), a diminuição da actividade da RuBisCo pode estar directamente relacionada com a vulnerabilidade desta proteína à oxidação, em resposta à aplicação quer de Mancozebe, quer de Ridomil. Devido ao facto destes grupos serem importantes para a manutenção da correcta conformação estrutural da RuBisCo (Takabe & Akazawa, 1975), alterações nestes grupos podem resultar numa diminuição da actividade catalítica e aumentar a subsequente degradação pelas proteases (Sugiyama *et al.*, 1968; Peñarrubia & Moreno, 1990). Na literatura existem referências à modificação oxidativa da RuBisCo, quando plantas de batateira são expostas ao ozono, admitindo-se que essa alteração pode aumentar a susceptibilidade da proteína à proteólise (Eckardt, 1993; Eckardt & Pell, 1994), hipótese que é também sugerida por outros, para explicar a degradação da RuBisCo durante a senescência e em resposta a situações adversas (Ferreira & Teixeira, 1992; Mehta *et al.*, 1992).

Embora não se conheça o modo bioquímico de acção do metalaxil, os dados disponíveis sugerem que este fungicida sistémico inibe principalmente a síntese de RNA (Ciba-Geigy, 1988); por isso, é também de admitir que a menor actividade da RuBisCo nas plantas tratadas com Ridomil pode estar relacionada com a diminuição da quantidade de mRNA para a síntese das subunidades da RuBisCo, a exemplo do que acontece quando as plantas são expostas a outras situações adversas (Eckardt & Pell, 1994). Estes autores verificaram que o ozono induz uma diminuição da quantidade de mRNA da subunidade menor da RuBisCo em plantas de *S. tuberosum*, efeito que era, no entanto, apenas observado em folhas relativamente jovens (4ª folha a partir do ápice).

A degradação da RuBisCo tem sido estudada por muitos grupos de investigadores, devido ao facto desta proteína se tornar na maior fonte de azoto durante a senescência foliar (Feller & Fischer, 1994 e referências), admitindo-se que uma alteração oxidativa da proteína antes da sua degradação, pode ser a resposta para explicar o catabolismo acelerado da RuBisCo que ocorre durante a senescência (Feller & Fischer, 1994).

Em todos os grupos de plantas, verificou-se após a 2ª colheita (41 dae) a manutenção dos níveis de proteínas solúveis em relação aos da 1ª colheita (24 dae), comportamento paralelo ao observado para a actividade da RuBisCo. As proteínas representam quantitativamente a mais importante fracção de azoto nas folhas, ocorrendo uma rápida degradação de proteínas quando as folhas começam a senescer (Feller & Fischer, 1994). A diminuição do teor em proteínas inicia-se devido ao aumento da proteólise e/ou devido ao reduzido processo de síntese que, geralmente, acompanha a senescência natural das plantas (Lamattina *et al.*, 1985). A diminuição das proteínas solúveis que ocorreu aos 55 dae relativamente à colheita anterior (41 dae), parece ser uma situação relacionada essencialmente com a idade das plantas, caracterizada por alterações metabólicas associadas com o crescimento dos tubérculos. De facto, as plantas de batateira armazenam azoto nas suas folhas, predominantemente na forma de proteínas solúveis (Millard & Marshall, 1986). A degradação destas proteínas, das quais a mais importante é a RuBisCo, representando cerca de 50% das proteínas solúveis foliares (Emes & Tobin, 1993; Hartman & Harpel, 1994), constitui um pré-requesito para a redistribuição de azoto para outras partes da planta, particularmente para ser re-utilizado no crescimento do tubérculo (Millard & Catt, 1988). Ao contrário do que acontece com o azoto das proteínas que é facilmente redistribuído com o início da senescência foliar, o azoto que resulta da degradação das clorofilas acumula-se no vacúolo e, de acordo com o conhecimento actual, não pode ser redistribuído e re-utilizado noutros locais da planta (Feller & Fischer, 1994).

Nas plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe verificou-se que após o 3º tratamento (55 dae), paralelamente à diminuição da actividade da RuBisCo e ao teor clorofilino, havia um aumento significativo das proteínas solúveis em relação às plantas controlo, observando-se simultaneamente alguns sintomas de senescência. Estes resultados sugerem que

enzimas relacionadas com a senescência podem ter sido sintetizadas, porque, muito embora a senescência foliar seja caracterizada essencialmente por acontecimentos catabólicos, existem indicações de que pode ocorrer a expressão de genes específicos da senescência (Feller & Fischer, 1994 e referências). Além disso, como a degradação das clorofilas requer a síntese de proteínas citoplasmáticas (Feller & Fischer, 1994), é provável que essa degradação seja catalizada por enzimas que são sintetizadas *de novo* sob a indução da senescência foliar (Matile *et al.*, 1992). Na última colheita de material (67 dae), apesar das plantas mostrarem diferentes graus de senescência, os níveis de proteínas solúveis eram semelhantes em todos os grupos.

A análise dos padrões electroforéticos das proteínas solúveis mostravam que aos 24 dae o tratamento com Ridomil estimulava a síntese de um polipéptideo (32 kDa), enquanto que aos 41 dae surgiam quatro bandas polipeptídicas (120, 34, 27 e 23 kDa) mais intensamente coradas no gel das plantas tratadas com Decis. Na literatura são frequentes referências a várias novas proteínas que são sintetizadas em resposta a condições ambientais alteradas e que têm sido referidas como "proteínas de stress" (Valluri *et al.*, 1989). As mais bem conhecidas destas proteínas surgem em resposta a temperaturas elevadas e são designadas proteínas de choque térmico (Helm *et al.*, 1993). Embora a síntese destas proteínas surja associada a uma condição ambiental particular, podem ser induzidas por outras situações adversas às plantas (Heikilla *et al.*, 1984). Considerando estes conhecimentos, parece ser plausível admitir, que as alterações quantitativas observadas são consequência dos tratamentos com os agroquímicos. Curiosamente, alguns dos polipéptidos que surgiam mais intensamente corados tinham massas moleculares que coincidem com um dos grupos das proteínas de choque térmico e, que é classificado, como grupo de baixa massa molecular. Este grupo abrange, segundo Helm *et al.* (1993), proteínas com massa molecular entre 16 e 30 kDa, enquanto outros consideram que inclui polipéptideos com massa molecular inferior a 35 kDa (Mason-Apps *et al.*, 1990). É provável que estas proteínas possam estar envolvidas na preservação das estruturas celulares durante a situação ambiental adversa a que a planta está exposta, como é admitido por Helm *et al.* (1993).

Pelos resultados obtidos verificou-se que as proteínas insolúveis não mostravam variações significativas entre as plantas tratadas e as controlo. No entanto, eram as plantas que evidenciavam sintomas de senescência mais pronunciados, quer as tratadas com Ridomil, quer as tratadas com Mancozebe, que apresentavam aos 67 dae valores mais baixos para as proteínas insolúveis. Ao estudarmos o comportamento das proteínas solúveis ao longo do ciclo de vida da planta observou-se que decresciam muito mais acentuadamente do que as insolúveis, situação que encontra paralelismo com o observado durante a senescência foliar em plantas de arroz (Hashimoto *et al.*, 1989).

Dado que a maior parte das proteínas insolúveis provêm das membranas dos tilacóides (Hashimoto *et al.*, 1989), parece poder admitir-se que uma redução acentuada nas proteínas insolúveis apenas deverá observar-se em situações de senescência muito avançada em que ocorre a degeneração das membranas dos tilacóides (Ford & Shibles, 1988). Além disso, deve-se também ter presente que as proteínas associadas com as clorofilas do complexo captador de luz, apesar de representarem uma percentagem considerável do azoto total da folha, parecem não estar acessíveis às proteases antes da degradação das clorofilas, ocorrendo portanto a remobilização daquelas proteínas só depois do anel de porfirina ser dissociado (Feller & Fischer, 1994 e referências).

A análise dos padrões eletroforéticos das proteínas insolúveis aos 67 dae, indicavam a ocorrência de algumas diferenças quantitativas, que admitimos não terem significado fisiológico relevante. No entanto, merece referência o facto de, no mesmo gel, no material tratado com Mancozebe, várias bandas polipeptídicas com massas moleculares entre 25 e 30 kDa apresentarem uma menor intensidade de coloração e, que podem ter resultado da degradação de algumas proteínas membranares, visto que polipeptídeos (normalmente 3 a 4) associados com os tilacóides, com massas moleculares entre 25 e 30 kDa, podem correlacionar-se com o complexo captador de luz associado ao fotossistema II (LHCII) (Huner *et al.*, 1992; Muraja-Fras *et al.*, 1994). Ainda no mesmo gel, uma banda com massa molecular de 55 kDa aparecia muito menos corada, do que a correspondente no material controlo. Esta banda polipeptídica, atendendo à sua massa molecular deve corresponder à subunidade maior da RuBisCo. Na verdade, esta banda polipeptídica é frequentemente

visualizada em SDS-PAGE de proteínas insolúveis (Nock *et al.*, 1992) e, sendo a RuBisCo uma proteína solúvel, admite-se que surge no gel das insolúveis, porque existem indicações de que esta proteína pode estar também associada com as membranas dos tilacóides (Campbell & Ogren, 1992).

A actividade respiratória, nas plantas controlo decresceu com o avanço da sua idade, o que sugere que existe uma correlação entre a idade da folha e a actividade respiratória, resultados concordantes com o referido por Moorby (1978). Por outro lado, as plantas responderam à primeira pulverização com Decis (24 dae), aumentando acentuadamente o consumo de oxigénio, enquanto que aos 41 e 55 dae, os níveis de actividade respiratória eram da mesma ordem de grandeza dos das plantas controlo. Estes resultados levam-nos a considerar que a sensibilidade da via respiratória nas plantas tratadas com Decis é dependente da idade (fase de desenvolvimento), sendo mais susceptível à interferência do insecticida na fase vegetativa das plantas. A energia resultante da maior actividade respiratória aos 24 dae, permitiria que ocorresse uma maior absorção de nutrientes e seu armazenamento durante esta fase inicial do crescimento das plantas. Os nutrientes acumulados poderiam ser mais tarde retranslocados e usados, permitindo tornar mais longo o ciclo de vida destas plantas. A actividade respiratória, após o 2º e 3º tratamentos era semelhante em todos os grupos de plantas apesar da quantificação ser feita na 3ª ou 4ª folha a partir do ápice, porém a actividade da RuBisCo surgia diminuída nas plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe. Este comportamento poderá ser explicado admitindo que, em contraste com a actividade fotossintética, o nível da actividade respiratória é mantido durante mais tempo, podendo fornecer energia durante o processo de senescência (Feller & Fischer, 1994 e referências).

Aos 55 dae a actividade respiratória e o nível de proteínas solúveis e clorofilas diminuiu em todos os grupos de plantas, com excepção das tratadas com Decis, em que o teor clorofilino se manteve relativamente à colheita anterior. O decréscimo poderia já ser resultado de estar a ocorrer início da senescência foliar. Nesta fase do desenvolvimento das plantas estava também a ocorrer tuberização e seria possivelmente a interacção "fonte" (folhas) - "recebedor" (tubérculo), que estava a actuar na planta como regulador da

senescência, como é admitido por outros investigadores (Feller & Fischer, 1994). Curiosamente, aos 67 dae, a actividade respiratória nas plantas controlo e nas tratadas com Ridomil ou com Mancozebe, era semelhante à da colheita anterior (55 dae) e semelhantes entre si, apesar de a nível macroscópico as plantas tratadas apresentarem senescência mais avançada, parecendo, portanto, que a actividade respiratória que estas possuíam seria suficiente para fornecer energia necessária para os processos biossintéticos que ocorrem durante a senescência, pois sabe-se que este processo degenerativo consome energia (Feller & Fischer, 1994 e referências).

Os resultados obtidos para os parâmetros estudados referentes ao metabolismo do azoto, mostraram que a aplicação dos agroquímicos utilizados afecta a actividade das enzimas responsáveis pela redução do NO_3^- a NO_2^-, e deste a NH_4^+. A actividade da isoforma da nitrato redutase (NR) estudada mostrou-se positivamente correlacionada nos quatro grupos de plantas com os níveis de ião nitrato acumulado nas folhas, de um modo semelhante ao referido por outros autores (Kapoor & Li, 1982). Apesar das plantas terem a mesma quantidade de azoto inorgânico disponível no campo, a actividade da isoforma da NR mostrou valores diferentes, surgindo algum paralelismo nas plantas tratadas com Ridomil e nas tratadas com Mancozebe. Tal como os níveis de nitrato acumulado nas folhas, a actividade da NR decresceu da 1ª para a 2ª colheita em todos os grupos de plantas. Tal comportamento está de acordo com o que se sabe sobre a absorção do azoto pelas plantas em desenvolvimento. De facto, tem sido referido que as plantas de batateira absorvem azoto em excesso principalmente na fase inicial do crescimento, de modo a aumentar a quantidade de azoto armazenado para ser retranslocado posteriormente (Millard & MacKerron, 1986; Millard *et al.*, 1989; Marshall & Voss, 1991). Dado que se estudou a isoforma da NR induzível pelo substrato (Streit *et al.*, 1987; Cathala *et al.*, 1992), os menores valores de actividade desta enzima estavam concordantes com a diminuição dos teores de nitrato acumulados.

O tratamento com Decis fez com que as plantas pudessem dispôr de um nível superior de azoto para ser incorporado em compostos orgânicos, já que aos 24 dae a actividade das enzimas NR e nitrito redutase (NiR) surgia significativamente aumentada nas plantas

tratadas com o insecticida, bem como um teor superior de nitrato acumulado. Os teores elevados de NO_3^- acumulado nas plantas jovens (24 dae) são indicativos de que a planta absorveu quantidades superiores às necessárias para o seu crescimento tendo, nas fases iniciais do ciclo de vida, produzido teores elevados de proteínas. Por outro lado, os elevados valores de actividade da NR e NiR, permitiram às plantas dispôr de um nível superior de azoto inorgânico para ser assimilado em compostos orgânicos, podendo o excesso de azoto, ser armazenado e retranslocado ulteriormente. Quando a absorção de NO_3^- excede a capacidade da sua redução, este ião acumula-se no vacúolo das células (Stienstra, 1986), o que segundo Runge (1983), ocorre mesmo na presença de suficiente actividade da NR para a redução do nitrato. Curiosamente, nas plantas tratadas com Decis, a actividade da NR mantinha níveis semelhantes aos 41, 55 e 67 dae, sendo nas duas primeiras colheitas igual ao controlo, enquanto que aos 67 dae surgia superior.

Os valores obtidos para o teor de ião nitrato nas folhas das plantas tratadas com Decis, aos 41 e 55 dae e, o aumento aos 67 dae da actividade da NR e do nível foliar de nitrato, são indicativos de que as plantas devem ter absorvido também o nitrato nesta fase adiantada do seu ciclo de vida. A manutenção da actividade da NR deve ter sido resultante de ter havido absorção de NO_3^- da solução do solo. Certamente, o facto de nas plantas tratadas com Decis, surgirem sempre níveis mais elevados de nitrato acumulado e, sobretudo, o aumento observado aos 67 dae, bem como a actividade da NR, contribuirão para o retardar da senescência nestas plantas. Esta interpretação tem presente os resultados de estudos realizados por Millard *et al.* (1989), que mostraram que ocorria uma absorção de nitrato por plantas de batateira numa fase já avançada do seu desenvolvimento, quando era realizada uma fertilização com azoto e verificaram que essa absorção atrasa a senescência foliar.

A absorção de nitrato requer energia metabólica (Sechley *et al.*, 1992) e a maior acumulação de nitrato nas plantas tratadas com Decis, aos 67 dae, é acompanhada por um aumento da actividade respiratória. Nestas plantas, o aumento da actividade da NR era acompanhado também por um aumento da NiR e da RuBisCo, evidenciando a estreita

ligação funcional que existe entre o metabolismo do carbono e do azoto, como salientado por outros (Sechley *et al.*, 1992).

Nas plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe, o comportamento das enzimas NR e NiR era diferente do descrito para as tratadas com Decis, pois a actividade ou não era afectada ou o era negativamente, sendo o Mancozebe mais agressivo para a NR, pois provocava diminuição da sua actividade, excepto num dos tratamentos, enquanto que o Ridomil provocava uma situação inversa. A aplicação do Ridomil ou do Mancozebe produzia efeito na actividade da NiR semelhante ao observado para a NR.

Embora havendo mais nitrato acumulado nas plantas tratadas com Ridomil aos 24 dae, do que nas controlo, a diferença apesar de significativa, é bastante inferior à diferença observada entre as plantas controlo e as tratadas com Decis. Possivelmente, a não ocorrência de aumento de actividade da NR nesta fase (com esta aplicação), poderá ser devida ao facto de o aumento da concentração da acumulação do nitrato não ser suficiente para provocar aumento da actividade da NR induzível e/ou resultar da inibição da síntese de RNA provocada pelo metalaxil, acção atribuída a este fungicida (Ciba-Geigy, 1988). Esta interferência do produto a este nível pode explicar a diminuição da actividade da NR e da NiR, neste grupo de plantas tratadas com Ridomil. Situações onde o decréscimo da actividade, quer da NR (Somers *et al.*, 1983), quer da NiR (Gupta & Beevers, 1984), resulta da diminuição da quantidade da proteína enzimática e não da inactivação, foram descritos como resposta a perturbações nas condições ambientais, como ausência de nitrato e luz, e condições hídricas adversas.

O fungicida Mancozebe exercia efeito negativo na actividade destas enzimas ainda mais acentuado do que o efeito do Ridomil. Porém, dado que o Ridomil é uma mistura de metalaxil e de mancozebe, é compreensível que se observe um certo grau de paralelismo nos efeitos provocados por estes dois fungicidas. O efeito mais acentuado do Mancozebe pode ser o resultado deste fungicida inibir a actividade da NR, interpretação que se apoia em dados recentes da literatura, que referem que fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos, ao qual pertence o Mancozebe, podem interferir com a actividade desta enzima (Wiegand-Rosinus *et al.*, 1992). Por outro lado, o estudo da degradação do Mancozebe quando

aplicado a folhas de plantas de pepino crescidas em estufa (Lehotay & Kisová, 1993), em igual concentração à utilizada no nosso trabalho, mostrou que o produto decresce muito gradualmente, com uma semi-vida de 14 dias. Considerando estes conhecimentos, o decréscimo da actividade da NR observado no nosso estudo, poderá ter surgido como consequência da inibição da sua actividade devido à presença do fungicida, uma vez que a colheita de material foliar era feita três dias após o tratamento com os produtos.

Há na literatura referência a situações em que os pesticidas aplicados às plantas podem sofrer nelas decomposição, a qual pode provocar, quer a desactivação, quer a activação desses produtos (Cole, 1994). Refere-se o caso do herbicida "bialaphos" que, quando aplicado a plantas, origina alanina e glufosinato. Destes dois produtos formados, o que actua como herbicida é o glufosinato. Este pode ser aplicado directamente às plantas e exerce a sua acção inibindo a actividade da glutamina sintetase (Wild & Ziegler, 1989).

No caso presente, o efeito observado dos fungicidas na actividade da NR e NiR, quer seja resultado de um efeito na diminuição da quantidade ou, por outro lado, surja como consequência de interferência na actividade destas proteínas enzimáticas, era concordante com a sintomatologia evidenciada pelas plantas, pois era bem notório que a aplicação dos fungicidas fazia com que a senescência ocorresse mais precocemente. Esta interpretação tem presente dados da literatura, que referem que associada à senescência foliar ocorre uma diminuição da actividade da NR, tendo sido verificado que durante a fase inicial a actividade desta enzima diminui, podendo mesmo deixar de ser detectada numa fase mais avançada do processo (Christensen *et al.*, 1981; Streit & Feller, 1982). A actividade da NiR também decresce durante a senescência foliar, porém de modo mais gradual que a NR (Gupta & Beevers, 1983).

No nosso material, observou-se em certos grupos de plantas um comportamento semelhante da NR e NiR e noutros um comportamento diferente. Considerando os valores da NR ao longo do ciclo de vida da planta, verificou-se que a actividade aos 41 dae sofre nos quatro grupos de plantas uma redução em média de 40-50% relativamente aos valores de 24 dae, portanto uma diminuição acentuada. Porém, ulteriormente o nível de actividade mantém-se, com excepção das plantas tratadas com Mancozebe em que a actividade na

última colheita é 50% inferior à detectada aos 41 dae. A actividade da NiR, nas plantas controlo e tratadas com Decis decresce cerca de 5-10% da 1ª para a 2ª colheita e desta para a 3ª cerca de 20%, sendo uma redução mais gradual que a da NR. Nos dois outros grupos de plantas ocorre apenas decréscimo da 2ª para a 3ª colheita e o Mancozebe provoca diminuição na última colheita cerca de 23%, parecendo ser neste grupo de plantas que o comportamento da NiR mais se assemelha ao descrito na literatura para o processo de senescência foliar.

A actividade da NiR manifesta uma maior sensibilidade aos agroquímicos utilizados que a NR. Na verdade, logo após o 1º tratamento a actividade da NiR era afectada, sendo promovida pelo Decis e diminuída pelos fungicidas, enquanto que a NR só surgia afectada positivamente pelo Decis.

Os resultados mostram que dos parâmetros estudados, duas das enzimas - a NiR e a RuBisCo - são mais sensíveis à acção dos fungicidas e curiosamente ambas têm localização cloroplastidial (Dalling *et al.*, 1972a,b; Kirk & Tilney-Bassett, 1978). Por outro lado, a estrutura destes organelos surgia também ligeiramente afectada nas plantas tratadas com os fungicidas. Este conjunto de resultados leva a considerar que os efeitos do Ridomil e do Mancozebe se manifestam preferencialmente nos cloroplastos.

O decréscimo de actividade da NR encontrada aos 41 dae, relativamente aos 24 dae, parece ser um resultado que se desvia do descrito para outras cultivares de batateira (Kapoor & Li, 1982). Estes autores referem que a actividade da NR mantém níveis constantes durante os primeiros 50 dias de crescimento e só depois ocorre uma diminuição da actividade enzimática à medida que as plantas senescem e, admitem, que o decréscimo de actividade da NR aos 50 dae, ocorre cerca de uma semana antes do início da tuberização. No nosso material, aos 33 dae, colheram-se tubérculos de pequenas dimensões para estudos bioquímicos, portanto a tuberização teve início entre a 1ª e a 2ª colheita (24 e 41 dae) e, embora a diminuição da actividade da NR surja de facto mais cedo do que refere Kapoor & Li (1982), ou seja, aos 41 dae e não aos 50 dae, ocorre, no entanto, antes da tuberização, pois na cultivar Désirée a tuberização inicia-se mais cedo do

que nas cultivares utilizadas por estes investigadores, portanto a aparente discordância entre o comportamento da NR observado e o descrito por Kapoor & Li (1982) não existe.

Os fungicidas utilizados - Ridomil e Mancozebe - possuem na sua composição manganésio e zinco e a sua aplicação nas plantas levou à acumulação destes iões nas folhas, surgindo em nível superior ao do controlo. O Ridomil provocava maior acumulação que o Mancozebe, o que é explicável, atendendo ao carácter sistémico do fungicida Ridomil. O maior aumento de manganésio do que o de zinco, nos dois grupos de plantas tratadas, parece estar directamente relacionado com a quantidade destes iões, pois o mancozebe contém 20% de manganésio e 2,5% de zinco, encontrando-se, portanto, uma correlação positiva entre a quantidade acumulada nas folhas e a presente nos agroquímicos Ridomil e Mancozebe.

O zinco e o manganésio são essenciais para o normal desenvolvimento das plantas, embora quando presentes em quantidades excessivas, podem ter efeitos nocivos. O zinco é constituinte de enzimas cloroplastidiais, como a anidrase carbónica e uma das isoformas da superóxido dismutase (Kirk & Tilney-Bassett, 1978), e parece ser necessário para a biossíntese das clorofilas em algumas plantas (Salisbury & Ross, 1985). Há também indicação de ser necessário para a produção de ácido indolacético (Salisbury & Ross, 1985; Taiz & Zeiger, 1991). Embora o zinco seja necessário para a actividade catalítica de proteínas enzimáticas, quantidades excessivas podem inibir a actividade de algumas enzimas, como se verifica acontecer com enzimas do grupo das metalo-proteases (Bushnell *et al.*, 1993).

O manganésio é também activador de várias enzimas, em particular, de descarboxilases e desidrogenases envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Taiz & Zeiger, 1991). Uma das funções mais importantes do manganésio deriva do facto de ser constituinte do complexo enzimático que está associado com o fotossistema II e que é responsável pela fotólise da água (Rawn, 1989), sendo por isso considerado um componente essencial deste fotossistema (Kirk & Tilney-Bassett, 1978).

A toxicidade do manganésio, à qual as plantas da batateira são bastante sensíveis, manifesta-se a nível foliar pelo desenvolvimento de clorose interfascicular que

progressivamente vai aumentando e, em casos mais acentuados, podem aparecer áreas necróticas nas margens das folhas (Rich, 1983; Hooker, 1986). No nosso material apesar de haver um aumento de manganésio provocado pelos fungicidas, certamente não atingiu nível que criasse uma situação de fitotoxicidade, pois nas folhas não surgiam os sintomas semelhantes aos descritos por estes autores. No entanto, a acumulação de manganésio que ocorreu nas plantas tratadas com os fungicidas pode, de certo modo, explicar os sintomas de senescência acelerada manifestados por estas plantas. Uma das funções do manganésio no metabolismo tem sido relacionada com a degradação do IAA, pela oxidase do ácido indolacético, verificando-se que extractos foliares de plantas crescidas com níveis demasiado elevados ou demasiado baixos de manganésio têm uma maior capacidade para a destruição do IAA (Taylor *et al.*, 1968). O IAA atrasa a senescência foliar (Goldthwaite, 1987) e, uma vez que níveis elevados de manganésio podem induzir alterações no metabolismo da auxina (Somda *et al.*, 1990), então podemos admitir que os sintomas de senescência que surgiram mais precocemente nas plantas tratadas com os fungicidas podem, pelo menos em parte, estar relacionados com interferência no metabolismo desta fito-hormona.

O tratamento das plantas com Decis não provocou qualquer variação na quantidade destes catiões nas folhas verificando-se, por isso, neste grupo de plantas um comportamento semelhante ao das plantas testemunho.

A nível ultraestrutural os agroquímicos utilizados não provocavam alterações acentuadas nas células do mesófilo, encontrando-se uma organização semelhante à observada por McCauley & Evert (1989) para o tecido clorofilino de *S. tuberosum*.

À medida que aumentava a idade das plantas, a alteração ultraestrutural mais evidente era o aumento das dimensões dos plastoglóbulos acompanhado pela diminuição do seu grau de osmiofilia, facto que era comum a todos os grupos de plantas e que são alterações que têm sido associadas ao processo de senescência. De facto, o aumento do tamanho dos plastoglóbulos tem sido descrito durante a senescência natural de *Betula verrugosa* Ehrb. (Dodge, 1970), *Triticum aestivum* L. (Hurkman, 1979) e *Oriza sativa* L. (Hashimoto *et al.*,

1989), e como resultado do tratamento com ozono (Pääkkönen *et al.*, 1995). Esta alteração é referida como a primeira alteração estrutural que se observa nos cloroplastos durante as fases iniciais da senescência e, parece estar relacionada com a acumulação de lípidos, resultantes da degradação das membranas dos tilacóides (Kirk & Tilney-Bassett, 1978).

O tratamento com Decis provocou diminuição do volume fraccional dos cloroplastos em relação à malha (Vv clor/ma) após a 1ª e 2ª aplicações e o volume fraccional do amido em relação aos cloroplastos (Vv am/clor) surgia sempre diminuído; nos cloroplastos os grana surgiam com maior número de tilacóides, bastante evidente após a 2ª e 3ª aplicações e, curiosamente, neste material também ocorria um aumento de clorofilas aos 55 dae. Dado que nestas plantas a actividade da RuBisCo era igual ou mesmo superior à encontrada nas plantas controlo, o menor Vv am/clor não deve resultar de haver menor assimilação de CO_2, mas deve ser antes o resultado de uma maior mobilização do amido. Curiosamente o Vv am/clor, assim como o Vv clor/ma, mantém-se constante ao longo do tempo e, aos 55 dae, a actividade da RuBisCo é igual à dos 41 dae, embora bastante superior à do controlo, parecendo que nas plantas tratadas com Decis haverá, na verdade, uma utilização mais intensiva do amido. A diminuição do Vv clor/ma provocada pelo Decis poderá ser consequência da menor quantidade de amido neles acumulado e/ou ser o resultado de um ajuste osmótico, dado que as folhas tratadas possuíam um menor teor hídrico (diferença de cerca de 1%) e situação de ajustamento osmótico dos cloroplastos foi observada em outras plantas, quando sujeitas a condições hídricas adversas (Santakumari & Berkowitz, 1991).

O Ridomil e o Mancozebe provocavam alterações ultraestruturais que se manifestavam principalmente a nível dos cloroplastos. Estas alterações eram mais acentuadas nas plantas tratadas com Mancozebe e eram consentâneas, quer com o aspecto geral das plantas, quer com as determinações bioquímicas realizadas.

A dilatação dos tilacóides que se observou ocorrer logo após o 1º tratamento com Mancozebe, são prenúncio de alterações no processo de senescência, embora nesta fase inicial do ciclo de vida da planta (24 dae) não fosse ainda notória qualquer diferença no grau de senescência das plantas no campo e, a nível bioquímico, apenas surgia alterada a

actividade das enzimas RuBisCo e NiR. Este fungicida provocou também a nível das mitocôndrias, uma diminuição da densidade da matriz e redução das cristas mitocondriais, sinais que são também considerados sintomáticos da senescência (Dodge, 1970; Pääkkönen *et al.*, 1995).

As modificações celulares observadas tornaram-se menos acentuadas após o 3º tratamento com os produtos (55 dae), o que pode resultar de numa fase mais avançada do seu ciclo de vida se tornarem menos sensíveis a estas drogas.

Alterações nos tilacóides semelhantes às provocadas pelo Ridomil e Mancozebe, têm sido associadas com a senescência natural (Dodge, 1970; Hurkman, 1979) e, também têm sido descritas ocorrer com bastante frequência, quando as plantas são submetidas a condições adversas, incluindo situações hídricas desfavoráveis (Freeman & Duysen, 1975; Ristic & Cass, 1991), tratamentos com herbicidas (Brezeanu *et al.*, 1976; Nieden & Neuman, 1978), temperaturas elevadas (Starck *et al.*, 1993) e tratamento com ozono (Pääkkönen *et al.*, 1995). Estes autores sugeriram que a formação de dilatações nos tilacóides, alterações nos plastoglóbulos e diminuição da densidade da matriz mitocondrial, são sintomas não específicos de muitas condições adversas ao crescimento das plantas. Segundo tal interpretação, as aplicações dos fungicidas Ridomil e Mancozebe criaram uma situação adversa capaz de conduzir a este tipo de reacção, enquanto que o Decis não.

O Ridomil e o Mancozebe também provocavam diminuição do Vv am/clor após o 2º e 3º tratamentos, enquanto que a actividade da RuBisCo surgia sempre diminuída. Este comportamento da RuBisCo nestas plantas leva a considerar que a redução do Vv am/clor deve ser sobretudo resultante da menor capacidade das plantas para assimilar o CO_2 e não da necessidade de uma maior mobilização do amido, como parece indicarem os valores da actividade respiratória e da actividade da NR encontrada nestas plantas. Situações em que é referida diminuição ou mesmo desaparecimento dos grãos de amido têm sido descritas, quando as plantas são sujeitas, durante o seu crescimento, a condições adversas de baixas temperaturas (Chen *et al.*, 1977), elevadas temperaturas (Starck *et al.*, 1993), tratamentos com insecticidas (Hatzios & Penner, 1978) e durante a senescência natural (Hashimoto *et al.*, 1989).

O Vv clor/ma não foi afectado pelo Mancozebe, enquanto que o Ridomil provocava um aumento no Vv clor/ma, com excepção do 1º tratamento (24 dae), diferença que poderá ser devida a uma situação de ajuste osmótico. Os resultados obtidos para o Vv clor/ma nas plantas tratadas com Ridomil ou Mancozebe, contrastam com os referidos por Hashimoto *et al.* (1989), que referem que ocorria uma diminuição no tamanho dos cloroplastos durante a senescência de plantas de arroz. Porém, a análise feita por estes autores foi baseada num método qualitativo, ao contrário da análise morfométrica realizada neste trabalho.

Os resultados obtidos indicam que a aplicação do insecticida Decis provocava alterações na fisiologia das plantas de batateira. Certamente o carácter lipofílico deste piretróide sintético (Heller *et al.*, 1991 e referências) facilita a absorção desta droga pelas células, o que explica a interferência do agroquímico ou dos produtos resultantes da sua degradação (Ruzo & Casida, 1979; Cole *et al.*, 1982) com o metabolismo destas plantas. A deltametrina (ingrediente activo do Decis) é degradada na superfície ou dentro das folhas das plantas por foto-isomerização, hidrólise da ligação ester e reacções de conjugação (Ruzo & Casida, 1979; Cole *et al.*, 1982).

Existem referências na literatura da estimulação do crescimento e da ocorrência de alterações fisiológicas em várias plantas, em resposta à aplicação de insecticidas, incluindo aumento de pigmentos e alterações no teor de hidratos de carbono (Pless *et al.*, 1971 e referências).

Para o carbofurão, um insecticida do grupo dos carbamatos, observou-se que em condições de campo este insecticida promovia o crescimento das plantas (Pless *et al.*, 1971; Daynard *et al.*, 1975) e, mais tarde, verificou-se que o efeito do carbofurão no crescimento das plantas é devido à acção inibitória dos seus metabolitos na degradação enzimática do ácido indolacético (Lee, 1977; Franco & Durán, 1981). Uma vez que o ácido indolacético atrasa a senescência foliar (Goldthwaite, 1987), a inibição da sua degradação pelos metabolitos do carbofurão permitirá que o ácido indolacético exerça durante mais tempo a sua acção estimuladora do crescimento, como é admitido por Lee (1977).

A interferência do Decis nos vários parâmetros que foram analisados das três vias metabólicas - redução do azoto inorgânico, fotossíntese e respiração - permitiu uma maior longevidade das plantas, em oposição aos efeitos dos fungicidas Ridomil e Mancozebe. Não se pode deixar de considerar que as alterações no padrão de desenvolvimento das plantas podem ter resultado da interferência destes agroquímicos no equilíbrio hormonal. De facto, sabe-se que algumas fito-hormonas são capazes de acelerar ou atrasar a senescência, sendo o equilíbrio hormonal ainda mais relevante para o controlo deste processo, do que o nível de determinada hormona (Feller & Fischer, 1994 e referências). Não deve por isso excluir-se a possível interferência destes produtos no metabolismo das fito-hormonas ou seus precursores, ou na distribuição das fito-hormonas dentro da planta.

4.2. Estudos em tubérculos

Os tratamentos das plantas com os agroquímicos tiveram repercussão não só na produtividade, mas também na qualidade nutricional dos tubérculos produzidos.

Em tubérculos colhidos aos 33 dae a actividade da ADP-glucose pirofosforilase não surgia afectada pelos tratamentos, enquanto que aos 77 dae sofria uma redução nos tubérculos das plantas tratadas, quer com Ridomil, quer com Mancozebe. A actividade encontrada aos 33 dae (tubérculos com 18-20 g e com diâmetro de cerca de 3 cm), situa-se próximo dos valores referidos para tubérculos com dimensões semelhantes (Mares & Marschner, 1980; Mares *et al.*, 1981). Obata-Sasamoto & Suzuki (1979) referem níveis de actividade da mesma enzima em tubérculos com 3,5 cm, cerca de 1000 vezes inferiores aos encontrados por nós e por outros investigadores (Mares & Marschner, 1980) e que parece dever-se ao facto de Obata-Sasamoto & Suzuki (1979) terem mantido os tubérculos armazenados a -20°C, um método que segundo Mares *et al.* (1985) inactiva a ADP-glucose pirofosforilase.

O decréscimo da actividade da enzima que ocorreu nos tubérculos colhidos aos 77 dae, está de acordo com o referido na literatura. De facto, a actividade da ADP-glucose pirofosforilase aumenta rapidamente durante as fases iniciais do desenvolvimento dos tubérculos (Sowokinos, 1976; Hawker *et al.*, 1979), atingindo valores máximos quando o tubérculo tem cerca de 1-1,5 cm de diâmetro (Sowokinos, 1976). A subida inicial na actividade desta enzima parece coincidir com a fase de divisão celular que ocorre durante o processo de tuberização e, de seguida, diminui. Esta aparente descida na actividade pode ser, em parte, um efeito de diluição em que a actividade enzimática por célula pode manter-se relativamente constante, mas a actividade por g de peso fresco de tecido decresce (Sowokinos, 1976). Este autor refere valores de actividade desta enzima, em tubérculos com 50 g e 5 cm de diâmetro, que são cerca de metade dos quantificados em tubérculos com 10 g e 3 cm de diâmetro, padrão de variação análogo ao encontrado no nosso estudo.

Nos tubérculos colhidos aos 33 dae e aos 77 dae não surgiram diferenças no teor de amido. É importante ter presente na interpretação dos resultados, que o teor em amido encontrado, resulta de um efeito cumulativo ao longo do tempo e, por essa razão, o teor

deste hidrato de carbono aos 77 dae surgia necessariamente aumentado relativamente ao quantificado aos 33 dae, apesar da actividade da ADP-glucose pirofosforilase ter diminuído em todos os grupos de tubérculos.

Actualmente, admite-se, que a síntese de amido nos orgãos fotossintéticos e não fotossintéticos é possivelmente regulada de um modo diferente (Smith *et al.*, 1995). Segundo estes investigadores, a síntese de amido nos orgãos fotossintéticos é regulada por alterações no equilíbrio entre a velocidade de assimilação do carbono e a velocidade de síntese de sacarose e sua exportação, enquanto que num orgão de reserva, como o tubérculo, a síntese de amido realiza-se provavelmente a uma velocidade relativamente constante, durante um período de desenvolvimento necessariamente longo, que corresponde à formação e crescimento do tubérculo.

Apesar da importância da ADP-glucose pirofosforilase na síntese do amido (Müller-Röber *et al.*, 1992) e de termos detectado numa das colheitas níveis diferentes da sua actividade nos tubérculos em formação, tal não conduziu a diferenças significativas no nível do amido acumulado. O facto de se ter observado, a nível foliar, diferenças na actividade da RuBisCo e no amido acumulado nos cloroplastos, poderia levar-nos a pensar que uma maior quantidade de foto-assimilados estariam a ser dirigidos para os tubérculos em desenvolvimento, conduzindo a diferenças no teor de amido, o que não se verificou. Tal comportamento poderá ser devido ao facto da capacidade dos tubérculos em formação para atrair os foto-assimilados ("capacidade de recebedor") ser igual, nos diferentes grupos de plantas.

Nos cloroplastos a síntese de amido está directamente correlacionada com os níveis de 3-PGA e inversamente com os níveis de Pi, existindo alguma incerteza se isto é o que se passa nos orgãos de reserva (Nakata *et al.*, 1994). Esta dúvida é apoiada por estudos recentes que mostraram que algumas plantas possuem uma forma específica da ADP-glucose pirofosforilase nas sementes, distinta da presente nas folhas e que é muito pouco sensível (Hylton & Smith, 1992), ou mesmo insensível, à regulação pelo 3-PGA e pelo Pi (Kleczkowski *et al.*, 1993). Mais recentemente, trabalhos realizados com batateira

mostraram que o gene da subunidade menor da ADP-glucose pirofosforilase é expresso, quer nas folhas, quer nos tubérculos, embora a regulação da enzima ocorra ao nível da transcrição nos tubérculos em crescimento, enquanto que nas folhas a regulação efectua-se ao nível da síntese e/ou da sua estabilidade (Nakata *et al.*, 1994).

No fim do ciclo cultural (cerca de 100 dae), o teor em amido dos tubérculos das plantas tratadas com Mancozebe ou Ridomil surgia afectado negativamente e o tratamento com Decis provocava uma situação inversa. O mais elevado teor em amido encontrado, induzido pelo Decis, está com certeza relacionado com a longevidade das folhas, pois um alongamento do ciclo de vida das plantas, resulta normalmente num mais elevado teor de matéria seca nos tubérculos, situação encontrada no nosso material e, constitui um factor determinante para uma boa produtividade (Burton, 1989). De facto, a produtividade das plantas tratadas com Decis foi superior à das plantas controlo. A maior duração do ciclo de vida das plantas permitiu que uma maior quantidade de foto-assimilados fossem desviados para o crescimento dos tubérculos e, consequentemente, surgiu um aumento no amido acumulado. O decréscimo de amido nos tubérculos das plantas tratadas com Ridomil ou com Mancozebe, parece ser resultado da senescência foliar ter surgido um pouco mais precocemente do que nas plantas controlo, o que afectou negativamente o teor de amido, não tendo, no entanto, repercussão na produtividade das plantas.

Apesar da quantidade de amido nos tubérculos das plantas tratadas sofrer alteração, a proporção de amilose era semelhante nos quatro grupos de tubérculos, tendo sido encontrado um valor em média de 22%. Este valor aproxima-se do valor que é geralmente encontrado, que é de cerca de 20% (Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1988; Burton, 1989), podendo esta proporção variar significativamente com a cultivar (Burton, 1989).

O teor de amido dos tubérculos é uma das principais características usadas para apreciar o seu valor nutricional e comercial. Por exemplo, na indústria das batatas fritas, devem ser usados tubérculos com um elevado teor em matéria seca, porque quanto maior fôr o teor em amido, menor quantidade de óleo é absorvido durante a fritura (Storey & Davies, 1992; Rageb & Wilcockson, 1995). Esta característica é do mesmo modo importante, quando o objectivo é a extracção de amido, porque neste caso, uma maior quantidade de amido torna

mais fácil e menos dispendioso o processo de desidratação. Hoje em dia, os revendedores de batatas para consumo começam também a mostrar algum interesse por este aspecto, porque as propriedades culinárias das batatas preparadas em casa são igualmente afectadas (Rageb & Wilcockson, 1995). A importância desta característica para avaliar o valor comercial dos tubérculos é evidenciada pelo interesse de empresas como a Monsanto Inc., que desenvolveu investigação na área da engenharia genética, com o objectivo de aumentar o teor em amido dos tubérculos, o que foi possível através da obtenção de plantas transgénicas, cujos tubérculos mostravam um teor em amido enriquecido em cerca de 5% (Vayda & Belknap, 1992 e referências), satisfazendo assim as necessidades das indústrias transformadoras de batata. Por todas estas razões, a diferença no teor de amido acumulado nos tubérculos das plantas tratadas é extremamente importante, pois tem consequência (positiva ou negativa) no valor nutritivo dos tubérculos.

Os níveis de proteínas totais surgiram inferiores nos tubérculos das plantas tratadas com os agroquímicos e, ao contrário, o teor de aminoácidos livres era afectado positivamente. Embora as batatas não sejam geralmente consideradas como uma fonte rica de proteínas, comparativamente a outros alimentos, podem contribuir significativamente sob o ponto de vista nutricional para as dietas em que o consumo *per capita* é elevado (Storey & Davies, 1992). As referências na literatura sobre o teor proteico são variáveis. Assim, de acordo com Storey & Davies (1992) os tubérculos podem conter entre 1,6 e 2,1 g de proteínas por 100 g de peso fresco, enquanto outros (Burton, 1989) consideram que o teor proteico varia entre 0,6 e 1,2 g por 100 g de peso fresco. O valor médio encontrado no nosso material foi de cerca de 1,3 g por 100 g de peso fresco, não se desviando dos referidos por aqueles autores.

Nos tubérculos das plantas tratadas ocorreu diminuição do teor proteico e aumento da quantidade de aminoácidos, embora a variação não tenha sido da mesma ordem de grandeza. Apesar destas alterações, a razão proteínas/aminoácidos era semelhante nos três grupos de tubérculos (cerca de 2,2-2,3) e bastante inferior à encontrada nos tubérculos controlo. A nível dos tubérculos observou-se paralelismo entre os resultados encontrados nas plantas tratadas com Ridomil ou com Mancozebe, comportamento que, em

parte, ocorria também a nível foliar. Os resultados obtidos para as proteínas totais e aminoácidos livres nos tubérculos das plantas tratadas com Decis, leva a considerar que, apesar de nas suas folhas o teor proteico ser superior após o 1º e 2º tratamentos e o ião nitrato surgir sempre aumentado, parece não ter tido qualquer efeito no teor de proteínas dos seus tubérculos. No entanto, se estas plantas dispunham de uma maior quantidade de azoto para ser utilizado durante o seu desenvolvimento, eventualmente, o aumento acentuado nos aminoácidos livres pode ter resultado de uma maior disponibilidade de azoto para ser transportado para os tubérculos durante o processo de tuberização, cuja fase final acompanha a senescência foliar. Segundo certos investigadores, o efeito do aumento da aplicação de fertilizante azotado geralmente aumenta a quantidade de aminoácidos livres e também de amidas (Desborough, 1985 e referências), no entanto, segundo este autor os aminoácidos constituintes das proteínas são muito mais importantes nutricionalmente do que os aminoácidos livres.

Apenas o tratamento com Ridomil provocava aumento significativo de zinco e manganésio, resultado que estará relacionado com o carácter sistémico deste fungicida. Esta interpretação é apoiada pelo comportamento ocorrido a nível foliar pois, quer o Ridomil, quer o Mancozebe, provocavam aumento nos níveis dos dois iões nas folhas. A acumulação de zinco e manganésio provocada pelo Ridomil nos tubérculos, embora significativa, era menor do que a nível foliar, o que deve resultar da fraca mobilidade destes iões (Salisbury & Ross, 1985).

Tal como a nível foliar, também nos tubérculos foi encontrada uma correlação positiva entre a quantidade de zinco e manganésio acumulada e a presente no fungicida Ridomil; o aumento em manganésio foi de cerca de 88%, enquanto que o de zinco foi apenas de 27%. Apesar destas alterações, os níveis de zinco e manganésio encontram-se dentro dos valores considerados normais para a composição mineral dos tubérculos, de acordo com dados referidos na literatura (Burton, 1989).

Considerando os resultados dos estudos realizados nos tubérculos poder-se-á afirmar que a aplicação do Mancozebe ou do Ridomil, apesar de não alterar a produtividade, conduziu

a uma desvalorização nutricional dos tubérculos, pois estes possuíam menor teor de amido e de proteínas. Relativamente ao efeito da aplicação do Decis realça-se o facto de ter provocado um aumento da produtividade e, quanto à qualidade dos tubérculos, poderemos ser levados a considerar ter ocorrido uma melhoria, se fôr dada maior importância ao nível de amido que possuíam. Para os defensores do valor nutricional dos tubérculos baseado no seu teor proteico, então ter-se-á que concluir que o Decis provocou diminuição da qualidade, pois baixou o nível de proteínas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as plantas não são indiferentes à aplicação dos agroquímicos Decis, Ridomil e Mancozebe. Foi verificado que estes produtos interferiram com a fisiologia das plantas de batateira, interferência que se manifestou inclusivamente na duração do seu ciclo de vida e que se repercutiu na qualidade nutricional dos tubérculos e, numa das situações, na própria produtividade das plantas.

Apesar dos numerosos melhoramentos introduzidos na agricultura moderna, o controlo das doenças e pragas das plantas continua a ser altamente dependente da aplicação de pesticidas, sendo estes aceites como um meio indispensável de salvaguardar as produções agrícolas. Não se vislumbrando para um futuro próximo outras estratégias de controlo de doenças e pragas, a utilização dos agroquímicos continua sendo um "mal necessário" na prática agrícola. Assim, para além de ser essencial conhecer o efeito dos pesticidas no agente causador da doença, é também importante conhecer a resposta das plantas e a do produto consumível que, no caso da batateira, é o tubérculo.

Sabe-se que é importante que os benefícios da protecção química das plantas sejam contrabalançados com os seus efeitos indesejáveis (poluição ambiental, efeitos nocivos na saúde pública) e é portanto aconselhável usar dosagens menores, que tenham o mesmo efeito no controlo de determinada doença ou praga. A este propósito, refira-se o exemplo de medidas tomadas pelo governo da Suécia, com o objectivo de reduzir a utilização de pesticidas na agricultura em 50%. De facto, o uso de pesticidas, decresceu de 4528 toneladas i.a./ano (1981-1985) para 2450 toneladas i.a./ano (1990). Esta diminuição foi conseguida através do uso de doses mais reduzidas (particularmente de herbicidas, o principal grupo de pesticidas usados na Suécia), melhoramentos na tecnologia usada para

a aplicação dos produtos e através da introdução de novos pesticidas, mais eficazes em doses menores (Pettersson, 1992; Jansma *et al.*, 1993).

Dos dois fungicidas usados, o Mancozebe, a nível do produto final afectou menos o valor nutricional do tubérculo do que o Ridomil, nomeadamente a nível do teor de amido e de proteínas. Embora o Ridomil seja um fungicida sistémico e, portanto, eficaz em controlar infecções do fungo responsável pela doença do míldio já instaladas no campo, situações haverá, na prática agrícola, em que este fungicida é usado preventivamente, quando eventualmente poderia ser usado o fungicida de contacto Mancozebe. Sempre que seja possível, parece-nos recomendável a utilização do Mancozebe, atendendo aos resultados dos parâmetros estudados, que mostraram uma qualidade nutricional superior dos tubérculos produzidos pelas plantas tratadas com este agroquímico.

Estudos realizados por Dowley & O'Sullivan (1994), durante sete anos consecutivos (1986 a 1992), em que foi testado o efeito de combinações mistas de mancozebe com fenilamida (um dos produtos usados foi o Ridomil® MZ 72), no controlo do míldio, mostraram que, comparativamente ao uso isolado de mancozebe, a aplicação das misturas resultava num atraso significativo do início da doença. No mesmo trabalho, são referidos que os efeitos benéficos do uso das misturas de mancozebe com fenilamida, nomeadamente na produção, foram obtidos principalmente nos anos em que a doença se tornou epidémica. Embora perspectivado no sentido de comparar a eficácia dos dois tipos de fungicidas no controlo do míldio, o trabalho de Dowley & O'Sullivan (1994), vem dar apoio à nossa indicação prática do uso de Mancozebe em alternativa ao de Ridomil, em situações em que não seja imprescindível o uso de um fungicida sistémico.

O insecticida Decis, usado no combate ao escaravelho, teve a nível do produto consumível um efeito positivo (teor de amido). O escaravelho americano ou escaravelho da batateira, é a praga mais destrutiva que ataca esta planta, correndo-se o risco de perder toda a produção se às plantas não fôr aplicado um insecticida adequado. Assim, atendendo à necessidade absoluta de controlar esta praga, pois é impossível manter a cultura sem tratar as plantas e aos efeitos benéficos encontrados na qualidade nutricional dos

tubérculos produzidos, então somos levados a concluir que a sua utilização é recomendada, sempre que tal se justifique.

É importante salientar que muitos dos fungicidas regularmente utilizados produzem excelentes resultados em relação à eficácia e qualidade do produto consumível. No entanto, como é salientado por alguns investigadores (De Waard *et al.*, 1993; Jansma *et al.*, 1993) existe uma tendência acentuada para que os fungicidas, tal como outros produtos usados na protecção das plantas, sejam usados em doses excessivas. Por isso, é imprescindível informar e educar os agricultores, de modo a melhorar o seu conhecimento dos riscos para o ambiente, saúde pública e para eles próprios e, estimulá-los a usar os pesticidas moderadamente e com segurança, de modo a minimizar os riscos associados com a sua utilização. Como refere De Waard *et al.* (1993), métodos alternativos para o controlo das doenças e pragas, nomeadamente o controlo biológico, são geralmente difíceis de desenvolver e, por isso, os pesticidas continuam a desempenhar o papel principal na luta contra doenças e pragas das plantas.

4.3. Estudos em tecido caloso

O estudo do comportamento de tecido caloso crescido na presença de Decis ou de Ridomil permitiu verificar a existência de um certo grau de paralelismo entre o sistema *in vitro* e *in vivo*.

A presença do Decis, aumentava no tecido caloso o teor de proteínas solúveis, logo após 5 h, diferença que poderá ser interpretada como sendo devida ao aumento da síntese de quatro polipéptidos, pois no gel de SDS-PAGE, quatro bandas com massas moleculares de cerca de 147, 113, 87 e 55 kDa, apareciam mais intensamente coradas. Este comportamento era provavelmente uma resposta imediata das células a esta situação adversa, decorrente da presença no meio de cultura do insecticida, uma vez que após 24 h de cultura não surgiam diferenças, nem nos níveis das proteínas solúveis, nem no padrão electroforético das bandas polipeptídicas, uma situação que possivelmente reflectia uma adaptação do tecido à presença do Decis no meio de cultura.

Uma situação diferente foi encontrada no tecido caloso crescido durante um período mais longo, pois após 14 dias, as proteínas solúveis diminuíram e as insolúveis aumentaram e, a análise dos padrões electroforéticos, indicavam também a ocorrência de algumas diferenças quantitativas. O aumento das proteínas insolúveis estava de acordo com a ultraestrutura das células. Na verdade, os plastídios destas células possuíam um sistema membranoso muito mais desenvolvido do que os plastídios das células do tecido controlo que, admitimos, estar relacionado com o mais elevado teor de proteínas insolúveis pois, como é referido por outros investigadores, as membranas dos tilacóides são uma importante fonte de proteínas insolúveis (Hashimoto *et al.*, 1989). O maior grau de diferenciação dos plastídios explica, também, a mais elevada quantidade de clorofilas encontrada no tecido tratado.

A presença do Ridomil no meio de cultura, provocava também, no tecido caloso, um aumento significativo das proteínas solúveis após 5 h e o respectivo padrão electroforético mostrou que surgia estimulada a síntese de alguns polipeptídeos com massas moleculares

entre 15 e 24 kDa. Estes polipeptídeos têm massas moleculares que coincidem com o grupo de baixa massa molecular das proteínas de choque térmico (Mason-Apps *et al.*, 1990; Helm *et al.*, 1993) e que têm sido relacionadas com a preservação das estruturas celulares, durante a situação adversa a que o material vegetal está exposto (Helm *et al.*, 1993). Tal como foi admitido para o caso do tecido tratado com Decis, é possivel que a estimulação de alguns polipeptídeos seja resultado de uma resposta rápida do tecido à presença do fungicida no meio de cultura, pois após 24 h, também não era detectada qualquer diferença nas proteínas solúveis e, no padrão electoforético, somente três bandas polipeptídicas (55, 49 e 47 kDa) surgiam mais intensamente coradas do que no tecido controlo. Após 14 dias, o teor de proteínas solúveis voltava a surgir mais elevado no tecido crescido na presença do Ridomil, observando-se, portanto, um comportamento análogo ao ocorrido às 5 h. As proteínas insolúveis apenas surgiam afectadas negativamente após 24 h de crescimento na presença do fungicida. A nível ultraestrutural os resultados mostraram que o tratamento provocava alteração de algumas estruturas celulares; a maior proliferação de retículo endoplasmático rugoso, é indicativo de uma maior actividade metabólica que, no caso presente, se traduziu no aumento do nivel de proteínas solúveis encontrado, após 14 dias. As alterações que ocorreram nas mitocôndrias (diminuição da densidade da matriz e redução do número de cristas) devem ser consequência da situação adversa a que se submeteu o tecido caloso, causada pela presença do fungicida no meio de cultura. Alterações semelhantes foram observadas no material foliar tratado com Mancozebe, como anteriormente referido, alterações que têm sido citadas como um dos sintomas de muitas condições adversas ao crescimento das plantas (Pääkkönen *et al.*, 1995).

A actividade das duas enzimas responsáveis pela redução sequencial do NO_3^- a NO_2^- e deste a NH_4^+, mostrou um comportamento sobreponível no tecido crescido na presença de Decis e nas plantas crescidas no campo, pois em ambos a actividade da NR e NiR surgia mais elevada, resultados que mostram que o Decis estimulava a actividade destas

enzimas de um modo semelhante nas plantas - sistema *in vivo* e no tecido caloso - sistema *in vitro*.

Entre o tecido controlo e o crescido com Ridomil não foi encontrada qualquer diferença na actividade da NR e da NiR e, nas plantas, a actividade destas enzimas apenas surgiu afectada num dos tratamentos com o fungicida. Estes resultados mostram também um certo grau de paralelismo entre a resposta do tecido à presença do Ridomil e o comportamento das plantas tratadas.

As observações ultraestruturais permitiram verificar que o Decis não provocava alterações acentuadas nas células do tecido caloso, observando-se em alguns aspectos uma certa analogia com os efeitos provocados na ultraestrutura das células mesofiliares das plantas crescidas no campo. Referimo-nos, concretamente, à ultraestrutura dos plastídios, que mostravam sistema membranoso mais desenvolvido e grãos de amido menos volumosos, resultados algo sobreponíveis aos observados nas plantas. Outros aspectos ultraestruturais observados no tecido em resposta à presença do Decis, era um aumento do número de vesículas associadas com os dictiossomas, que consideramos poder ser o resultado da estimulação de algumas vias metabólicas. Se tivermos presente que neste tecido tratado com Decis, frequentemente podiam observar-se depósitos densos em electrões, pode ser admitido que a abundância do tipo de vesículas que foram observadas pode, de certo modo, estar relacionada com o transporte do referido material. De facto, uma correlação entre o transporte mediado por este tipo de vesículas revestidas e o seu conteúdo não selectivo tem sido referido na literatura (Alberts *et al.*, 1989).

Como referimos, os plastídios apresentavam um sistema lamelar mais desenvolvido, diferenças que levam a supor que o Decis ou metabolitos resultantes da sua degradação favorecem a diferenciação dos plastídios. Em geral, as condições de crescimento que existem nas culturas *in vitro* não são adequadas ao desenvolvimento de cloroplastos, porém, estes podem formar-se quando certas condições são convenientemente manipuladas (Husemann, 1985). No tecido caloso usado como controlo não se desenvolveram cloroplastos e a diferenciação destes organelos quando o tecido crescia na

presença de Decis, parece dar suporte à interpretação de que esta droga, ou alguns dos seus produtos de degradação, parecem ultrapassar a limitação existente ao processo de diferenciação imposta pelas condições de cultura.

O Decis não afectou negativamente o crescimento do tecido, estimulando até o desenvolvimento do sistema membranoso nos plastídios. Considerando o comportamento do tecido caloso crescido na presença de Decis e a resposta das plantas crescidas no campo tratadas com este mesmo produto, poder-se-á concluir que o efeito do Decis é semelhante, relativamente aos parâmetros estudados, o que indica que este tipo de estudos deve ser continuado para verificar da possibilidade do uso deste sistema *in vitro* como modelo, para avaliar os efeitos de agroquímicos usados correntemente na cultura da batateira.

Verificou-se, também, a ocorrência de um certo grau de paralelismo entre o comportamento do tecido caloso crescido na presença de Ridomil e a resposta das plantas crescidas no campo. A nível bioquímico, a única excepção diz respeito ao teor clorofilino, pois enquanto no sistema *in vitro* o fungicida não provocava qualquer diferença, a aplicação do produto às plantas, diminuía o teor em clorofilas (excepto após 1º tratamento). As imagens ultraestruturais do tecido tratado também não mostravam as alterações evidenciadas pelas plantas, que se manifestavam a nível dos cloroplastos e se caracterizavam por dilatações dos tilacóides. A ausência de paralelismo nestes dois aspectos, pode ser explicada pelo facto dos plastídios presentes no tecido caloso não terem capacidade fotossintética, o que apenas se verifica quando as células ou tecidos em cultura, têm um crescimento fotoautotrófico (Husemann, 1985).

A vantagem de utilizar culturas *in vitro* no estudo de certas vias metabólicas, reside no facto de puderem ter capacidade de metabolizar os pesticidas de um modo análogo às plantas intactas. Existem na literatura referências que os metabolitos resultantes da degradação do metalaxil (um dos constituintes do Ridomil) nas plantas intactas são semelhantes aos que ocorrem nas culturas de tecidos (Cole & Owen, 1987 e referências), o que leva estes autores a considerarem que o uso das culturas *in vitro*, para estudar o metabolismo do metalaxil, é uma alternativa válida ao uso de plantas intactas. No nosso

trabalho, o objectivo foi fazer um estudo comparativo das alterações provocadas pelo Ridomil nas plantas, com as verificadas no sistema *in vitro*, e não estudar os produtos da sua degradação; no entanto, dado que o metalaxil sofre transformações semelhantes nos dois sistemas experimentais (Cole & Owen, 1987 e referências) admitimos, perante os resultados obtidos, que pelo menos em relação a algumas vias metabólicas, o sistema *in vitro* constitui um modelo alternativo e de interesse para o estudo dos efeitos do fungicida Ridomil.

Em conclusão, as culturas *in vitro* podem ser extremamente úteis para o estudo de certos efeitos dos agroquímicos usados na cultura da batateira, permitindo ultrapassar dificuldades impostas pelo caracter sazonal da cultura desta planta, pois com o sistema *in vitro* dispõe-se de material ao longo do ano. Outra vantagem do uso deste sistema resulta da possibilidade de manter determinadas condições de cultura, o que permite a realização e repetição de muitos ensaios em situações perfeitamente comparáveis o que é, por vezes, complicado quando este tipo de estudos é realizado com plantas crescidas no campo.

5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Neste trabalho procurou-se estudar certos aspectos do comportamento fisiológico de plantas de batateira (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) crescidas no campo em resposta a aplicações de agroquímicos, correntemente utilizados na prática agrícola desta cultura, bem como analisar as eventuais repercussões desses tratamentos na qualidade dos tubérculos e também na produtividade. Seleccionaram-se dois fungicidas, um de contacto (Shell Mancozebe® 80) e um sistémico (Ridomil® MZ 72), normalmente utilizados no controlo do fungo responsável pela doença do míldio da batateira e, um insecticida (Decis®), regularmente empregue no combate ao escaravelho da batateira.

Para avaliar o grau de correlação existente entre a resposta das plantas intactas aos tratamentos com os agroquímicos e a do tecido caloso, foram feitos estudos semelhantes utilizando uma cultura estabelecida de tecido caloso proveniente do mesófilo de *S. tuberosum*.

• A aplicação dos agroquímicos às plantas de batateira, provocou alterações no seu desenvolvimento, tendo como consequência, a nível macroscópico, o aparecimento de

sinais de senescência desfasados no tempo relativamente ao controlo. O insecticida Decis atrasava a senescência, prolongando o ciclo de vida das plantas, enquanto que os fungicidas (Ridomil ou Mancozebe) provocavam o aparecimento mais precoce de sintomas de senescência, comparatimente às plantas testemunho.

• O estudo do comportamento das três vias metabólicas - redução do azoto inorgânico, fotossíntese e respiração - através da quantificação da actividade de algumas enzimas e do consumo de O_2 mostrou que a aplicação dos agroquímicos provocava alterações nos vários parâmetros analisados.

• O Decis teve efeito positivo na actividade da enzima responsável pela assimilação do CO_2, a RuBisCo; as plantas tratadas mostravam níveis constantes de actividade após cada uma das três aplicações e, mesmo depois da última colheita de material, a actividade desta enzima surgia superior ao controlo. O teor clorofilino não variava inicialmente (24 e 41 dae) e era afectado positivamente após a 3ª aplicação do insecticida, resultados concordantes com a ausência de sintomas vísiveis de senescência que surgiram mais tardiamente nestas plantas.

Comportamento diferente foi encontrado quando às plantas era aplicado Ridomil ou Mancozebe, observando-se um certo grau de paralelismo nos efeitos provocados pelos dois fungicidas. A actividade da RuBisCo surgia afectada negativamente após cada tratamento, assim como o teor clorofilino, com excepção da 1ª aplicação.

• O teor de proteínas solúveis aumentava em resposta às duas primeiras aplicações de Decis, enquanto que apenas a última aplicação de Ridomil ou de Mancozebe provocava aumento destes compostos. As proteínas insolúveis, nos três grupos de plantas tratadas,

não era afectadas. O padrão eletroforético em SDS-PAGE revelou em qualquer um dos casos (solúveis ou insolúveis) apenas diferenças quantitativas.

• O Decis provocava estimulação da isoforma induzível da NR após a 1ª aplicação, diferença que desapareceu com os dois tratamentos subsequentes. A actividade da NiR surgia também aumentada significativamente após as duas primeiras aplicações; aos 67 dae voltava a registar-se uma maior actividade enzimática, quer da NR, quer da NiR, do que nas plantas controlo. A aplicação de Decis produziu também efeito positivo no teor de ião nitrato acumulado nas folhas, comportamento que se mantinha aos 67 dae. O efeito do Decis na actividade da NR e NiR e no teor proteico foi particularmente acentuado na fase vegetativa das plantas pois, após a última aplicação do produto, a resposta das plantas tratadas era semelhante à das plantas controlo.

Comportamento diferente era o das plantas tratadas com Ridomil ou com Mancozebe. A actividade da NR e NiR ou não era afectada ou o era negativamente. O Mancozebe mostrou-se mais agressivo para a NR do que o Ridomil, pois provocava diminuição na actividade enzimática, excepto num dos tratamentos, enquanto que o Ridomil conduzia a uma situação inversa. Resposta análoga foi encontrada para a actividade da NiR. Este fungicida provocou um aumento de ião nitrato apenas após o 1º tratamento, enquanto que a aplicação de Mancozebe não exercia qualquer efeito no teor de nitrato acumulado. Nestes dois grupos de plantas tratadas com os fungicidas, numa fase mais adiantada do ciclo de vida, aos 67 dae, registou-se um decréscimo nos níveis de NO_3^-.

• A actividade respiratória era estimulada pelo Decis, mas apenas após a 1ª aplicação do insecticida (24 dae) e numa fase mais avançada do ciclo de vida das plantas (67 dae). Não se observou qualquer variação da actividade respiratória, em resposta à aplicação de Ridomil ou de Mancozebe.

• O tratamento das plantas com os fungicidas Ridomil ou Mancozebe provocou acumulação dos iões zinco e manganésio, surgindo este sempre significativamente aumentado nos dois conjuntos de plantas tratadas. Comportamento semelhante era observado para o zinco, quando era aplicado Ridomil, enquanto que nas plantas tratadas com Mancozebe, o teor do ião zinco surgia aumentado apenas aos 55 e 67 dae.

O aumento mais acentuado de manganésio do que de zinco, parece estar relacionado com a quantidade dos iões presente nos dois fungicidas. Por outro lado, a acumulação, quer de zinco, quer de manganésio, era superior nas plantas pulverizadas com Ridomil, provavelmente, devido ao facto de ser um fungicida sistémico.

• A nível ultraestrutural, as células mesofiliares das plantas tratadas com Decis apresentavam características semelhantes às das folhas controlo. Apenas surgiam algumas alterações a nível dos cloroplastos sendo, as mais evidentes, a diminuição da quantidade de amido acumulado nos cloroplastos e um maior número de tilacóides nos grana. Os fungicidas provocavam, também, alterações a nível dos cloroplastos, que se caracterizavam pelo aparecimento de dilatação dos tilacóides. Estas alterações eram mais pronunciadas no material foliar tratado com Mancozebe, do que no pulverizado com Ridomil.

A aplicação de Mancozebe também provocava alterações a nível das mitocôndrias, as quais evidenciavam diminuição da densidade da matriz.

As alterações observadas tornavam-se menos acentuadas após a última aplicação dos fungicidas, o que nos leva a concluir que, as plantas numa fase mais adiantada do seu ciclo de vida se tornavam menos sensíveis às drogas utilizadas, pois após 3ª aplicação (55 dae), podia observar-se uma certa recuperação da estrutura normal.

• A análise morfométrica mostrou que o volume fraccional dos cloroplastos não era afectado pela aplicação de Mancozebe e surgia aumentado pelos dois últimos tratamentos com

Ridomil. Ao contrário, a 1ª e 2ª aplicações de Decis provocavam diminuição do volume fraccional dos cloroplastos.

O volume fraccional do amido em relação aos cloroplastos era afectado negativamente pelo tratamento com os três agroquímicos; o Decis provocava sempre diminuição no volume fraccional do amido, enquanto que os fungicidas tinham apenas efeito após os dois últimos tratamentos (41 e 55 dae).

• No conjunto, os resultados obtidos a nível foliar, quer nas plantas tratadas com Ridomil, quer nas tratadas com Mancozebe, levam-nos a concluir que a acção destes dois fungicidas é exercida preferencialmente nos cloroplastos, pois para além da estrutura destes organelos surgir alterada, também a nível bioquímico as enzimas mais afectadas negativamente - NiR e RuBisCo - têm localização cloroplastidial.

• Numa fase intermédia da formação dos tubérculos o insecticida Decis, quer aos 33, quer aos 77 dae, não afectava a actividade da enzima ADP-glucose pirofosforilase, enquanto que os fungicidas tiveram repercussão negativa na actividade desta enzima, mas apenas aos 77 dae. O teor de amido acumulado, quantificado aos 33 e aos 77 dae não variava significativamente nos quatro conjuntos de tubérculos.

• O tratamento das plantas com Ridomil ou com Mancozebe teve consequências negativas no valor nutricional dos tubérculos colhidos no fim do ciclo de cultura, que apresentavam um menor teor de amido e também de proteínas, provocando o Mancozebe efeitos menos acentuados do que o Ridomil. A quantidade de aminoácidos livres surgiu superior nos tubérculos provenientes dos dois conjuntos de plantas tratadas. O Ridomil provocava também, nos tubérculos, acumulação de zinco e manganésio, não sendo, no entanto, ultrapassados os valores normais referidos na literatura.

• O efeito estimulante do Decis nos vários parâmetros bioquímicos avaliados a nível foliar, tiveram repercussão positiva na qualidade nutricional dos tubérculos, que se manifestou por um aumento significativo no teor de amido. A quantidade de proteínas surgiu diminuída e, ao contrário, foram encontrados níveis mais elevados de aminoácidos livres. Nestas plantas também a produtividade (t/ha) surgiu aumentada. A aplicação de Decis revelou-se um processo eficaz para controlar o escaravelho e, por outro lado, teve efeitos benéficos a nível do produto consumível.

• Os resultados obtidos com o tecido caloso, quer a nível bioquímico, quer a nível ultraestrutural, mostraram que o comportamento deste sistema *in vitro* é semelhante ao das plantas, relativamente a alguns dos parâmetros estudados.

• A adição de Decis ao meio de cultura mostrou que, após 5 h, o teor de proteínas solúveis era afectado positivamente, surgindo também no gel de SDS-PAGE algumas diferenças quantitativas. Este comportamento parece resultar de uma resposta rápida das células à presença do insecticida, pois após 24 h não foram encontradas diferenças. Após 14 dias as proteínas solúveis surgiram diminuídas e, o padrão electroforético, revelou que apenas ocorriam alterações quantitativas. As proteínas insolúveis não mostravam inicialmente diferenças (5 h e 24 h), surgindo, aos 14 dias, estimuladas no tecido crescido na presença de Decis.

• As proteínas solúveis, no tecido crescido na presença de Ridomil mostravam um comportamento semelhante ao descrito para o caso do Decis, após 5 h e 24 h ; após 14 dias, as proteínas solúveis surgiram de novo positivamente afectadas no tecido tratado; os padrões electroforéticos mostravam apenas diferenças quantitativas. A presença de

Ridomil provocava diminuição das proteínas insolúveis, mas apenas após 24 h, enquanto que os geles de SDS-PAGE eram semelhantes em qualquer situação (5 h, 24 h e 14 dias).

• O teor clorofilino, quantificado aos 14 dias, surgia aumentado no tecido tratado com Decis, enquanto que a presença de Ridomil no meio de cultura, não provocava alteração neste parâmetro bioquímico.

• De um modo semelhante, a actividade da NR e da NiR era estimulada pelo Decis, não se observando qualquer variação em resposta à presença de Ridomil, resultados que mostram uma certa analogia com os obtidos nas plantas.

• A nível ultraestrutural, a organização geral das células do tecido tratado com Decis ou com Ridomil era semelhante à das células do tecido caloso controlo; observou-se, em particular para o caso do Decis, um grau de correlação elevado, com os efeitos provocados na ultraestrutura das células do mesófilo das plantas crescidas no campo.

No tecido crescido na presença de Decis surgiram algumas alterações a nível dos plastídios, que se manifestavam por um maior grau de diferenciação destes organelos, que apresentavam um sistema membranoso mais desenvolvido e grãos de amido menos volumosos. Neste tecido, observava-se também, um aumento do número de vesículas associadas com os dictiossomas e depósitos de material electronodenso.

A presença de Ridomil no meio de cultura provocou alterações na ultraestrutura das mitocôndrias, que mostravam diminuição da densidade da matriz e redução no número de cristas, observando-se também, uma maior abundância de cisternas de retículo endoplasmático rugoso.

• O conjunto de resultados obtidos com o sistema *in vitro* leva-nos a considerar ser plausível a utilização deste sistema como modelo experimental para avaliar alguns efeitos dos agroquímicos Decis e Ridomil, atendendo ao elevado grau de correlação existente, entre a resposta das plantas aos tratamentos com os agroquímicos e a do tecido caloso. A utilização deste modelo é vantajosa, pois permite ultrapassar uma dificuldade inerente ao caracter sazonal da cultura da batateira, o que é extremamente útil na prática, pois permite-nos dispôr de material vegetal ao longo do ano.

∴

A avaliação dos resultados no seu conjunto, leva-nos a considerar que o conhecimento adquirido neste trabalho, a nível da planta e consequente repercussão na qualidade dos tubérculos, contribuiu para melhor compreender o comportamento da batateira quando tratada com os agroquímicos Decis, Ridomil e Mancozebe. Neste estudo, obtiveram-se também, resultados de utilidade prática, dado que permitiu conhecer consequências do tratamento nas características do produto final e produtividade. No entanto, pensamos ser necessário estudar alguns aspectos em que subsistam dúvidas e/ou que ficaram em aberto. Com essa finalidade, procuraremos continuar e aprofundar o estudo incidindo nos seguintes aspectos:

• quantificar a proteína enzimática RuBisCo a fim de saber se os agroquímicos interferem com a sua síntese ou só com a sua actividade; utilização, também, de técnicas de "western blotting" para verificar se a síntese surge alterada e conhecer qual das subunidades será eventualmente afectada (subunidade maior e/ou subunidade menor).

• na sequência da quantificação da actividade das enzimas NR e NiR, estudar a actividade das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase, de modo a conhecer a interferência dos agroquímicos no processo de assimilação do azoto.

• tentar determinar o possível envolvimento de algumas fito-hormonas (nomeadamente de citocininas e ácido indolacético) no padrão de desenvolvimento das plantas, em resposta à aplicação dos agroquímicos.

• dada a diferente acumulação de amido nos tubérculos, procurar-se-á obter conhecimento sobre o processo de partição dos foto-assimilados e síntese do amido, através do estudo do comportamento de enzimas envolvidas (nomeadamente actividade da sacarose sintase) e, recorrendo a técnicas de biologia molecular, analisar níveis de mRNA dessas enzimas, por meio de análise de "northem blotting", em diferentes situações experimentais.

• nos tubérculos, tentar identificar os aminoácidos, para avaliar se o aumento surgido nos tubérculos das plantas tratadas tem interesse sob o ponto de vista nutricional.

• com o objectivo de aumentar a aplicabilidade do sistema *in vitro,* procurar desenvolver os estudos relativos à sua utilização, nomeadamente criar condições para que o tecido tenha a capacidade de crescer fotoautotroficamente, o que permitiria dispôr de um modelo mais adequado para o estudo da interferência, a nível bioquímico e fisiológico, dos agroquímicos no crescimento, diferenciação e metabolismo celular.

6. BIBLIOGRAFIA

Ahloowalia, B. S. 1982 - Plant regeneration from callus culture in potato. *Euphytica* **31**: 755-759.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. 1989 - *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, Inc., New York, London.

Allicchio, R., Antonioli, C., Graziani, L., Roncarati, R. and Vannini, C. 1987 - Isozyme variation in leaf-callus regenerated plants of *Solanum tuberosum. Plant Sci.* **53**: 81-86.

Anderson, J. A. and Done, J. 1978 - Light-dependent assimilation of nitrite by isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **61:** 692-697.

Anderson, J. M., Okita, T. W. and Preiss, J. 1990 - Enhancing carbon flow into starch: the role of ADPglucose pyrophosphorylase. In: *The molecular and cellular biology of the potato*, Biotechnology in Agriculture no 3, (eds. M. E. Vayda and W. D. Park), CAB International, UK, pp. 159-180.

Andrews, M. 1986 - The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.* **9**: 511-519.

Arnon, D. I. 1949 - Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.

Artschwager, E. 1918 - Citado por Cutter, E. C. 1992.

Artschwager, E. 1924 - Citado por Cutter, E. C. 1992.

Aslam, M. and Huffaker, R. C. 1984 - Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. *Plant Physiol.* **75**: 623-628.

Aslam, M., Travis, R. L. and Huffaker, R. C. 1992 - Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **99**: 1124-1133.

Austin, S. and Cassells, A. C. 1983 - Variation between plants regenerated from individual calli produced from separated potato stem callus cells. *Plant Sci. Lett.* **31**: 107-114.

Austin, S., Baer, M. A. and Helgeson, J. P. 1985 - Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Sci.* **39**: 75-82.

Back, E., Dumme, W., Schneiderbauer, A., de Framond, A., Rastogi, R. and Rothstein, S. J. 1991 - Citado por Oaks, A. 1994a.

Badenhuizen, N. P. and Salema, R. 1967 - Observations on the development of chloroamyloplasts. *Revista Biol.* **6**: 139-155.

Bajaj, Y. P. S. 1985 - Cryopreservation of germplasm of potato (Solanum tuberosum L.) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz): viability of excised meristems cryopreserved up to four years. *Indian J. Exp. Biol.* **23**: 285-287.

Bajaj, Y. P. S. 1987 - Biotechnology and 21st century potato. In: *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 3, (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3-22.

Bajaj, Y. P. S. and Dionne, L. A. 1966 - Virus X free roots from infected potato plants. *Am. Potato J.* **43**: 384.

Bajaj, Y. P. S. and Sopory, S. K. 1986 - Biotechnology of potato improvement. In: *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 2, Crops I, (ed. Y. P. S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 429-454.

Bashan, B., Levy, Y. and Cohen, Y. 1991 - Synergistic interactions between phenylamide fungicides and respiration inhibitors in controlling phenylamide-resistant populations of *Phytophthora infestans* on potato tuber disks. *Phytoparasitica* **19**: 73-77.

Bárcia, M. 1986 - O míldio e o escaravelho da batateira. *Ao Serviço da Lavoura* **185**: 10-12.

Beck, E. and Ziegler, P. 1989 - Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 95-117.

Beevers, L. and Hageman, R. H. 1980 - Nitrate and nitrite reduction. In: *The biochemistry of plants*, vol. 5, (ed. B. J. Miflin), Academic Press, New York, pp. 115-168.

Beraud, J., Brun, A., Feray, A., Hourmant, A. and Penot, M. 1992 - Long distance transport of ^{14}C-putrescine in potato plantlets (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **188**: 169-176.

Beutler, H. O. 1984 - Starch. In: *Methods of enzymatic analysis*, vol. 6, (ed. H. U. Bergmeyer), Verlag Chemie Weinheim, Basel, pp. 2-10.

Binding, H., Jain, S. M., Finger, J., Mordhorst, G., Nehls, R. and Gressel, J. 1982 - Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* **63**: 273-277.

Booth, A. 1963 - Citado por Cutter, E. C. 1992.

Botella, J. R., Verbelen, J. P. and Valpuesta, V. 1988a - Immunocytolocalization of glutamine synthetase in green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **88**: 943-946.

Botella, J. R., Verbelen, J. P. and Valpuesta, V. 1988b - Immunocytolocalization of ferredoxin-GOGAT in the cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **87**: 255-257.

Bowsher, C. G., Boulton, E. L., Rose, J., Nayagam, S. and Emes, M. J. 1992 - Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J.* **2**: 893-898.

Bowsher, C. G., Hucklesby, D. P. and Emes, M. J. 1993 - Induction of ferredoxin-$NADP^+$ oxidoreductase and ferredoxin synthesis in pea root plastids during nitrate assimilation. *Plant J.* **3**: 463-467.

Bowsher, C. G., Long, D. M., Oaks, A. and Rothstein, S. J. 1991 - Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots. *Plant Physiol.* **95**: 281-285.

Bradford, M. 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brangeon, J., Hirel, B. and Forchioni, A. 1989 - Immunogold localization of glutamine synthetase in soybean leaves, roots, and nodules. *Protoplasma* **151**: 88-97.

Brändén, C.-I., Lindqvist, Y. and Schneider, G. 1991 - Protein engineering of rubisco. *Acta Cryst.* **B47**: 824-835.

Brezeanu, A. G., Davis, D. G. and Shimabukuro, R. H. 1976 - Ultrastructural effects and translocation of methyl-2-(4-(2,4-dichlorophenoxy)-phenoxy)propanoate in wheat (*Triticum aestivum*) and wild oat (*Avena fatua*). *Can. J. Bot.* **54**: 2038-2048.

Brunetti, N. and Hageman, R. H. 1976 - Comparison of *in vivo* and *in vitro* assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **58**: 583-587.

Brunswick, P. and Cresswell, C. F. 1988 - Nitrite uptake into intact pea chloroplasts. II. Influence of electron transport regulators, uncouplers, ATPase and anion uptake inhibitors and protein binding reagents. *Plant Physiol.* **86**: 384-389.

Bryan, J. K. 1990 - Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. In: *The biochemistry of plants*, vol. 16, (eds. P. K. Stumpf and E. E. Conn), Academic Press, New York, pp. 161-195.

Burton, W. G. 1989 - *The potato*, 3rd ed, Longman Scientific & Technical, London.

Bushnell, T. P., Bushnell, D. and Jagendorf, A. T. 1993 - A purified zinc protease of pea chloroplasts, EP1, degrades the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase/oxigenase. *Plant Physiol.* **103**: 585-591.

Butenko, R. G. and Kuchko, A. A. 1980 - Physiological aspects of procurement, cultivation, and hybridization of isolated potato protoplasts. *Sov. Plant Physiol.* **26**: 901-909.

Callaci, J. J. and Smarrelli, Jr., J. 1991 - Regulation of the inducible nitrate reductase isoform from soybeans. *Biochem. Biophys. Acta* **1088**: 127-130.

Camp, P. J., Huber, S. C., Burke, J. and Moreland, D. E. 1982 - Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves. *Plant Physiol.* **70**: 1641-1646.

Campbell, W. J. and Ogren, W. L. 1992 - Light activation of rubisco by rubisco activase and thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* **33**: 751-756.

Carvalho, H., Pereira, S., Sunkel, C. and Salema, R. 1992 - Detection of a cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunocytochemical methods. *Plant Physiol.* **100**: 1591-1594.

Cassells, A. C., Goetz, E. M. and Austin, S. 1983 - Phenotypic variation in plants produced from lateral buds, stem explants and single-cell-derived callus of potato. *Potato Res.* **26**: 367-372.

Cathala, N., Conejero, G., Gojon, A., Passama, L. and Robin, P. 1992 - Determination of the distribution of three nitrate reductase isoforms in soybean seedlings by chromatography and a simple method based on assay conditions. *Physiol. Plant.* **85**: 541-548.

Chanda, S. V., Joshi, A. K., Krishnan, P. N. and Singh, Y. D. 1987 - In vivo nitrate reductase activity in leaves of pearl millet, *Pennisetum americanum* (L.) Leeke. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 125-134.

Chapman, H. W. 1958 - Tuberization in the potato plant. *Physiol. Plant.* **11**: 215-224.

Chen, P., Li, P. H. and Cunningham, W. P. 1977 - Ultrastructural differences in leaf cells of some *Solanum* species in relation to their frost resistance. *Bot. Gaz.* **138**: 276-285.

Cheng, C.-L., Acedo, G. N., Dewdney, J., Goodman, H. M. and Conkling, M. A. 1991 - Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.* **96**: 275-279.

Christensen, L. E., Below, F. E. and Hageman, R. H. 1981 - The effect of ear removal on senescence and metabolism of maize. *Plant Physiol.* **68**: 1180-1185.

Ciba-Geigy, 1988 - Ridomil® MZ 72 WP. Technical product information. Ciba-Geigy Limited, Switzerland.

Cole, D. J. 1994 - Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pestic. Sci.* **42**: 209-222.

Cole, D. J. and Owen, W. J. 1987 - Metabolism of metalaxyl in cells suspension of *Lactuca sativa* L. and *Vitis vinifera* L.. *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**: 354-361.

Cole, L. M., Casida J. E. and Ruzo, L. O. 1982 - Comparative degradation of the pyrethroids tralomethrin, tralocythrin, deltamethrin, and cypermethrin on cotton and bean foliage. *J. Agric. Food Chem.* **30**: 916-920.

Corbett, J. R., Wright, K. and Baillie, A. C. 1984 - *The biochemical mode of action of pesticides*, 2nd ed, Academic Press, London.

Crawford, N. M., Wilkinson, J. Q. and LaBrie, S. T. 1992 - Control of nitrate reduction in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**: 377-385.

Cutter, E. C. 1992 - Structure and development of the potato plant. In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), 2nd ed, Chapman & Hall, London, pp. 64-161.

Dailey, F. A., Warner, R. L., Somers, D. A. and Kleinhofs, A. 1982 - Characteristics of a nitrate reductase in a barley mutant deficient in NADH nitrate reductase. *Plant Physiol.* **69**: 1200-1204.

Dalling, M. J., Tolbert, N. E. and Hageman, R. H. 1972a - Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. I. Spinach and tobacco leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **283**: 505-512.

Dalling, M. J., Tolbert, N. E. and Hageman, R. H. 1972b - Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. II. Wheat roots. *Biochim. Biophys. Acta* **283**: 513-519.

Dann, M. S. and Pell, E. J. 1989 - Decline of activity and quantity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase and net photosynthesis in ozone-treated potato foliage. *Plant Physiol.* **91**: 427-432.

Datta, D. B., Cai, X., Wong, P. P. and Triplett, E. W. 1991 - Immunocytochemical localization of glutamine synthetase in organs of *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Physiol.* **96**: 507-512.

Davies, H. V. and Ross, H. A. 1985 - Factors affecting *in vivo* and *in vitro* determinations of nitrate reductase activity in potato leaves. *J. Plant Physiol.* **119**: 1-7.

Davies, H. V., Ross, H. A. and Oparka, K. J. 1987 - Nitrate reduction in *Solanum tuberosum* L.: development of nitrate reductase activity in field-grown plants. *Ann. Bot.* **59**: 301-309.

Davis, D. J. and San Pietro, S. 1977 - Interactions between spinach ferredoxin and other electron carriers. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**: 266-272.

Daynard, T. B., Ellis, C. R., Bolwyn, B. and Misener, R. L. 1975 - Effects of carbofuran on grain yield of corn. *Can. J. Plant Sci.* **55**: 637-639.

De Waard, M. A., Georgopoulos, S. G., Hollomon, D. W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. N. and Schwinn, F. J. 1993 - Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 403-421.

Delaney, M. E. and Walker, D. A. 1978 - Comparison of the kinetic properties of ribulose bisphosphate carboxylase in chloroplast extracts of spinach, sunflower and four other reductive pentose phosphate-pathway species. *Biochemistry* **171**: 477-482.

Deng, M.-D., Moureaux, T., Leydecker, M.-T. and Caboche, M. 1990 - Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* **180**: 257-261.

Desborough, S. L. 1985 - Potato proteins. In: *Potato physiology*, (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 329-351.

Dizengremel, P. 1985 - Potato respiration: electron transport pathways. In: *Potato physiology* (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 59-121.

Dodds, J. H. 1990 - Molecular biology of potato: current and future prospects for developing countries. In: *The molecular and cellular biology of the potato*, Biotechnology in Agriculture no 3, (eds. M. E. Vayda and W. D. Park), CAB International, UK, pp. 223-232.

Dodge, J. D. 1970 - Changes in chloroplasts fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. *Ann. Bot.* **34**: 817-824.

Dowley, L. J. and O'Sullivan, E. 1994 - The effect of phenylamide/mancozeb mixtures on the control of late blight of potatoes. *Irish J. Agric. Food Res.* **33**: 177-181.

Dry, I. B., Dimitriadis, E., Ward, D. and Wiskich, J. T. 1987 - The photorespiratory hydrogen shuttle. *Biochem. J.* **245**: 669-675.

Ducreux, G., Rossignol, L. and Rossignol, M. 1986 - La pomme de terre. *La Recherche* **17**: 192-203.

Duncan, D. A. and Ewing, E. E. 1984 - Initial anatomical changes associated with tuber formation on single-node potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings. *Ann. Bot.* **53**: 607-610.

Echeverria, E., Boyer, C., Thomas, P. A., Liu, K.-C. and Shannon, J. C. 1988 - Enzyme activities associated with maize kernal amyloplasts. *Plant Physiol.* **86**: 786-792.

Eckardt, N. A. 1993 - Citado por Eckardt, N. A. and Pell, E. J. 1994.

Eckardt, N. A. and Pell, E. J. 1994 - O_3-induced degradation of Rubisco protein and loss of Rubisco mRNA in relation to leaf age in *Solanum tuberosum* L.. *New Phytol.* **127**: 741-748.

Edwards, J. W. and Coruzzi, G. M. 1989 - Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* **1**: 241-248.

Edwards, J. W., Walker, E. L. and Coruzzi, G. M. 1990 - Cell-specific expression in transgenic plants reveals non-overlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3459-3463.

El-Antably, H. M. M., Wareing, P. F. and Hillman, J. 1967 - Some physiological responses to d,l abscisin (dormin). *Planta* **73**: 74-90.

Emes, M. J. and Fowler, M. W. 1979 - The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. *Planta* **144**: 249-253.

Emes, M. J. and Tobin, A. K. 1993 - Control of metabolism and development in higher plant plastids. *Int. Rev. Cytol.* **145**: 149-216.

Enyedi, A. J., Nancy, A. E. and Pell, E. J. 1992 - Activity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase from potato cultivars with differential response to ozone stress. *New Phytol.* **122**: 493-500.

Espinoza, N. O. and Dodds, J. H. 1985 - Adventitious shoot formation on cultured potato roots. *Plant Sci.* **41**: 121-124.

Espinoza, N. O., Estrada, R., Silva-Rodriguez, D., Tovar, P., Lizarraga, R. and Dodds, J. H. 1986 - The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture* **15:** 21-26.

Evans, H. J. and Nason, A. 1953 - Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.* **28**: 233-254.

Evans, J. R. 1983 - Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **72**: 297-302.

Ewing, E. E. 1985 - Cuttings as simplified models of the potato plant. In: *Potato physiology* (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 153-207.

Ewing, E. E. 1987 - The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum*) tuberization. In: *Plant hormones and their role in plant growth and development,* (ed. P. J. Davies), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 515-538.

Ewing, E. E. 1990 - Induction of tuberization in potato. In: *The molecular and cellular biology of the potato*, Biotechnology in Agriculture no 3, (eds. M. E. Vayda and W. D. Park), CAB International, UK, pp. 25-41.

Ewing, E. E. and Struik, P. G. 1992 - Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth. *Hort. Rev.* **14**: 89-198.

FAO, 1993 - *FAO production yearbook 1992.* FAO, Rome.

Faure, J.-D., Vincentz, M., Kronenberger, J. and Caboche, M. 1991 - Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *Plant J.* **1**: 107-113.

Feller, U. and Fischer, A. 1994 - Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**: 241-273.

Fellows, R. F. and Geiger, D. R. 1974 - Structural and physiological changes in sugar beet leaves during sink to source conversion. *Plant Physiol.* **54**: 877-885.

Feray, A., Hourmant, A., Beraud, J., Brun, A., Cann-Moisan, C., Caroff, J. and Penot, M. 1992 - Influence of polyamines on the long distance transport of K (^{86}Rb) in potato cuttings (*Solanum tuberosum* cv. Sirtema) - comparative study with some phytohormones. *J. Exp. Bot.* **43**: 403-408.

Ferrão, J. E. M. 1992 - *A aventura das plantas e os descobrimentos portugueses.* Lisboa, pp. 68-70.

Ferreira, R. M. B. and Teixeira, A. R. N. 1992 - Sulfur starvation in *Lemna* leads to degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase without plant death. *J. Biol. Chem.* **267**: 7253-7257.

Ferro, D. N., Yuan, Q.-C., Slocombe, A. and Tuttle, A. F. 1993 - Residual activity of insecticides under field conditions for controlling the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* **86**: 511-516.

Fischer, P. and Klein, U. 1988 - Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **88**: 947-952.

Fish, N. and Jones, M. 1988 - Engineering somatic hybrid potatoes. *Plants Today* (March-April): 47-49.

Fish, N., Karp, A. and Jones, M. G. K. 1987 - Improved isolation of dihaploid *Solanum tuberosum* protoplasts and the production of somatic hybrids between dihaploids *S. tuberosum* and *S. brevidens*. *In Vitro Cell. & Dev. Biol.* **23**: 575-580.

Fontem, D. A. and Aighewi, B. 1993 - Effect of fungicides on late blight control and yield loss of potato in the western highlands of Cameroon. *Intern. J. Pest Manag.* **39**: 152-155.

Ford, D. M. and Shibles, R. 1988 - Photosynthesis and other traits in relation to chloroplast number during soybean leaf senescence. *Plant Physiol.* **86**: 108-111.

Forde, B. G., Day, H. M., Turton, J. F., Wen-Jun, S., Cullimore, J. V. and Oliver, J. E. 1989 - Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell* **1**:391-401.

Franco, C. and Durán, N. 1981 - Metabolites of carbofuran: effect on indole-3-acetic acid degradation. *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**: 136-140.

Freeman, T. P. and Duysen, M. E. 1975 - The effect of imposed water stress on the development and ultrastructure of wheat chloroplasts. *Protoplasma* **83**: 131-145.

Friedrich, J. W. and Huffaker, R. C. 1980 - Photosynthesis, leaf resistances and ribulose 1,5-biphosphate carboxylase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiol.* **65**: 1103-1107.

Fukuda, H., Ito, M., Sugiyama, M. and Komamine, A. 1994 - Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems. *Int. J. Dev. Biol.* **38**: 287-299.

Galangau, F., Daniel-Vedele, F., Moureaux, T., Dorbe, M.-F., Leydecker, M.-T. and Caboche, M. 1988 - Expression of nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.* **88**: 383-388.

Gautheret, R. J. 1985 - History of plant tissue and cell culture: a personal account. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, (ed. I. K. Vasil), Academic Press, London, pp. 1-59.

Gawronska, H., Dwelle, R. B., Pavek, J. J. and Rowe, P. 1984 - Partitioning of photoassimilates by four potato clones. *Crop Science* **24**: 1031-1036.

Giaquinta, R. T. 1980 - Translocation of sucrose and oligosaccharides. In: *Biochemistry of plants*, vol. 3, (ed. J. Preiss), Academic Press, New York, pp. 271-320.

Glass, A. D. M., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J. and Rufty, Jr., T. W. 1990 - Studies of the uptake of nitrate in barley. *Plant Physiol.* **93**: 1585-1589.

Gojon, A., Plassard, C. and Bussi, C. 1994 - Root/shoot distribution of NO_3^- assimilation in herbaceous and woody species. In: *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*, (eds. J. Roy and E. Garnier), SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, pp. 131-147.

Goldthwaite, J. J. 1987 - Hormones in plant senescence. In: *Plant hormones and their role in plant development*, (ed. P. J. Harris), Martnus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 553-573.

Gregory, L. E. 1956 - Some factors for tuberization in the potato plant. *Am. J. Bot.* **43**: 281-288.

Guan, H. P. and Janes, H. W. 1991 - Light regulation of sink metabolism in tomato fruit. II. Carbohydrate metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* **96**: 922-927.

Guerreiro, M. V. 1987 - A cultura da batata, sua introdução na Europa. O caso de Portugal. *Mem. Acad. Ciên. de Lisboa, C. Letras* **26**: 7-24.

Guiz, C., Hirel, B., Shedlofsky, G. and Gadal, P. 1979 - Occurrence and influence of light on the relative proportions of two glutamine synthetases in rice leaves. *Plant Sci. Lett.* **15**: 271-277.

Gupta, S. C. and Beevers, L. 1983 - Environmental influences on nitrite reductase activity in *Pisum sativum* L. seedlings. *J. Exp. Bot.* **34**: 1455-1462.

Gupta, S. C. and Beevers, L. 1984 - Synthesis and degradation of nitrite reductase in pea leaves. *Plant Physiol.* **75**: 251-252.

Hagen, S. R. and Muneta, P. 1993 - Effect of temperature on carbohydrate content, ADP glucose pyrophosphorylase, and ATP- and PPi-dependent phosphofructokinase activity of potato tuber callus tissue. *Plant Cell, Tiss. & Org. Cult.* **32**: 115-121.

Hagen, S. R., Muneta, P. LeTourneau, D. and Brown, J. 1991 - Effect of temperature on the starch content of potato callus tissue. *Am. Potato J.* **68**: 191-195.

Hannapel, D. J., Miller Jr., J. C. and Park, W. D. 1985 - Regulation of potato tuber protein accumulation by gibberellic acid. *Plant Physiol.* **78**: 700-703.

Harker, A. R., Narayanan, K. R., Warner, R. L. and Kleinhofs, A. 1986 - NAD(P)H bispecific nitrate reductase in barley leaves: partial purification and characterization. *Phytochemistry* **25**: 1275-1279.

Hartman, F. C. and Harpel, M. R. 1994 - Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 197-234.

Hartmann, H. T. and Kester, D. E. 1975 - *Plant propagation, principles and practices*, 3rd ed, Prentice-Hall, New Jersey.

Hashimoto, H., Kura-Hotta, M. and Katoh, S. 1989 - Changes in protein content and in the structure and number of chloroplasts during leaf senescence in rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **30**: 707-715.

Hatzfeld, W.-D. and Stitt, M. 1990 - A study of the rate of recycling of triose phosphates in heterotrophic *Chenopodium rubrum* cells, potato tubers, and maize endosperm. *Planta* **180**: 198-204.

Hatzios, K. K. and Penner, D. 1978 - The effect of diflubenzuron [1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea] on soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] photosynthesis, respiration, and leaf ultrastructure. *Pestic. Biochem. Physiol.* **9**: 65-69.

Hawker, J. S., Marscher, H. and Krauss, A. 1979 - Starch synthesis in developing potato tubers. *Physiol. Plant.* **46**: 25-30.

Hawkes, J. G. 1978 - Biosystematics of the potato. In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), 1st ed, Chapman & Hall, London, pp. 16-69.

Hawkes, J. G. 1992 - History of the potato. In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), 2nd ed, Chapman & Hall, London, pp. 1-12.

Hecht, U., Oelmüller, R., Schmidt, S. and Mohr, H. 1988 - Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta* **175**: 130-138.

Heikkila, J. J., Papp, J. E. T., Schultz, G. A. and Bewley, J. D. 1984 - Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid, and wounding. *Plant Physiol.* **76**: 270-274.

Heldt, H. W., Flügge, U.-I. and Borchert, S. 1991 - Diversity of specificity and function of phosphate translocators in various plastids. *Plant Physiol.* **95**: 341-343.

Heller, J. J., Roâ, L. and Bechmann, G. 1991 - Rational use of deltamethrin on potato against *Leptinotarsa decemlineata* and other significant pests. *Bulletin OEPP/EPPO* **21**: 23-26.

Helm, K. W., LaFayette, P. R., Nagao, R. T., Key, J. L. and Vierling, E. 1993 - Localization of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 238-247.

Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. and Brown, S. B. 1987 - Citado por Matile, P., Schellenberg, M. and Peisker, C. 1992.

Hide, G. A. and Lapwood, D. H. 1992 - Disease aspects of potato production. In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), 2nd ed, Chapman & Hall, London, pp. 403-437.

Hill, L. M. and Smith, A. M. 1991 - Evidence that glucose 6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing embryos. *Planta* **185**: 91-96.

Hirel, B. and Gadal, P. 1980 - Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol.* **66**: 619-623.

Hirel, B., Perrot-Rechenmann, C., Suzuki, A., Vidal, J. and Gadal, P. 1982 - Glutamine synthetase in spinach leaves. Immunological studies and immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* **69**: 983-987.

Hiscox, J. and Israelstam, G. 1979 - A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* **57**: 1332-1334.

Hodgins, R. R. and van Huystee, R. B. 1986 - Rapid simultaneous estimation of protoporphyrin and Mg-porphyrins in higher plants. *J. Plant Physiol.* **125**: 311-323.

Hooker, W. J. 1986 - *Compendium of potato diseases*, 3rd ed, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Horton, D. and Sawyer, R. L. 1985 - The potato as a world food crop, with special reference to developing areas. In: *Potato physiology*, (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 1-34.

Horton, D. E. and Anderson, J. L. 1992 - Potato production in the context of the world and farm economy. In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), 2nd ed, Chapman & Hall, London, pp. 794-815.

Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., De Vries, J. N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, B. and Feenstra, W. J. 1988 - Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. *Potato Res.* **31**: 241-246.

Huber, S. C. and Huber, J. L. 1992 - Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* **99**: 1275-1278.

Hudson, G. S., Evans, J. R., von Caemmerer, S., Arvidsson, Y. B. C. and Andrews, T. J. 1992 - Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* **98**: 294-302.

Hulme, J. S., Higgins, E. S. and Shields, R. 1992 - An efficient genotype-independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.* **31**: 161-167.

Huner, N. P. A., Campbell, D., Krol, M., Hayden, D. B., Myscich, E. M., Basalyga, S. and Williams, J. P. 1992 - Differential detergent stability of the major light-harvesting complex II in thylakoids isolated from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Physiol.* **99**: 830-836.

Huppe, H. C. and Turpin, D. H. 1994 - Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 577-607.

Hurkman, W. J. 1979 - Ultrastructural changes of chloroplasts in attached and detached, aging primary wheat leaves. *Amer. J. Bot.* **66**: 64-70.

Husemann, W. 1985 - Photoautotrophic growth of cells in culture. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, (ed. I. K. Vasil), Academic Press, Inc., New York, London, pp. 213-252.

Hylton, C. and Smith, A. M. 1992 - The *rb* mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADP glucose pyrophosphorylase from developing embryos. *Plant Physiol.* **99**: 1626-1634.

INE, 1994 - *Balança alimentar portuguesa 1980-1992.* INE, Lisboa.

Ingle, J., Joy, K. W. and Hageman, R. H. 1966 - The regulation activity of the enzymes involved in the assimilation of nitrate by higher plants. *Biochem. J.* **100**: 577-588.

IPSR & JIC, 1994 - *AFRC Institute of Plant Science Research & Jonh Innes Institute Centre*, (ed. J. A. Downie), Annual Report 1993, Norwich, pp. 24-25.

Jansma, J. E., van Keulen, H. and Zadoks, J. C. 1993 - Crop protection in the year 2000: a comparison of current policies towards agrochemical usage in four West European countries. *Crop Prot.* **12**: 483-489.

Jaworski, E. G. 1971 - Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**: 1274-1279.

Jiang, C.-Z., Rodermel, S. R. and Shibles, R. M. 1993 - Photosynthesis, rubisco, activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. *Plant Physiol.* **101**: 105-112.

Kaiser, W. M. and Brendle-Behnisch, E. 1991 - Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. *Plant Physiol.* **96**: 363-367.

Kaiser, W. M. and Förster, J. 1989 - Low CO_2 prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol.* **91**: 970-974.

Kamachi, K., Amemiya, Y., Ogura, N. and Nakagawa, H. 1987 - Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Cell Physiol.* **28**: 333-338.

Kamachi, K., Yamaya, T., Hayakawa, T., Mae, T. and Ojima, K. 1992 - Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol.* **99**: 1481-1486.

Kamachi, K., Yamaya, T., Mae, T. and Ojima, K. 1991 - A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* **96**: 411-417.

Kapoor, A. C. and Li, P. H. 1982 - Effects of age and variety on nitrate reductase and nitrogen fractions in potato plants. *J. Sci. Food Agric.* **33**: 401-406.

Kelling, P. L., Wood, J. R., Tyson, R. H. and Bridges, I. G. 1988 - Starch biosynthesis in developing wheat grain. *Plant Physiol.* **87**: 311-319.

Kendall, A. C., Wallsgrove, R. M., Hall, N. P., Turner, J. C. and Lea, P. J. 1986 - Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* **168**: 316-323.

Keys, A. J., Bird, I. F., Cornelius, M. J., Lea, P. J., Wallsgrove, R. M. and Miflin, B. J. 1978 - Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741-743.

King, B. J., Siddiqi, M. Y. and Glass, A. D. M. 1992 - Studies of the uptake of nitrate in barley. *Plant Physiol.* **99**: 1582-1589.

King, B. J., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., Warner, R. L. and Glass, A. D. M. 1993 - Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiol.* **102**: 1279-1286.

Kirk, J. T. O. and Tilney-Bassett, R. A. E. 1978 - *The plastids. Their chemistry, structure, growth and inheritance*, 2nd ed, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdan, New York.

Kleczkowski, L. A., Villand, P., Lüthi, E., Olsen, O.-A. and Preiss, J. 1993 - Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiol.* **101**: 179-186.

Kleinhofs, A. and Warner, R. L. 1990 - Advances in nitrate assimilation. In: *The biochemistry of plants*, vol. 16, (eds. P. K. Stumpf and E. E. Conn), Academic Press, New York, pp. 89-120.

Koda, Y. and Kikuta, Y. 1991 - Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. *Plant Cell Physiol.* **32**: 629-633.

Koda, Y. and Okazawa, Y. 1988 - Detection of potato tuber-inducing activity in potato leaves and old tubers. *Plant Cell Physiol.* **29**: 969-974.

Koda, Y., Kikuta, Y., Kitahara, T., Nishi, T. and Mori, K. 1992 - Comparisons of various biological activities of stereoisomers of methyl jasmonate. *Phytochemistry* **31**: 1111-1114.

Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S. and Yoshihara, T. 1991 - Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* **30**: 1435-1438.

Koda, Y., Omer, E.-S. A., Yoshihara, T., Shibata, H., Sakamura, S. and Okazawa, Y. 1988 - Isolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves. *Plant Cell Physiol.* **29**: 1047-1051.

Koda, Y., Takahashi, K. and Kikuta, Y. 1994 - Involvement of jasmonic acid and related compounds in the tuberization of Jerusalem artichoke plants (*Helianthus tuberosus* L.). *Jpn. J. Crop Sci.* **63**: 333-338.

Kozaki, A., Sakamoto, A., Tanaka, K. and Takeba, G. 1991 - The promoter of the gene for glutamine synthetase from rice shows organ-specific and substrate-induced expression in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* **32**: 353-358.

Kramer, V., Lahners, K., Back, E., Privalle, L. S. and Rothstein, S. 1989 - Transient accumulation of nitrite reductase mRNA in maize following the addition of nitrate. *Plant Physiol.* **90**: 1214-1220.

Krauss, A. 1985 - Interactions of nitrogen nutrition, phytohormones, and tuberization. In: *Potato physiology* (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 209-260.

Krauss, A. and Marschner, H. 1982 - Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abcisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res.* **25**: 13-21.

Kumar, D. and Wareing, P. F. 1972 - Factors controlling stolon development in the potato plant. *New Phytol.* **71**: 639-648.

Laemmli, U. K. 1970 - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lam, S.-L. 1977 - Plantlet formation from potato tuber discs *in vitro*. *Am. Potato J.* **54**: 465-468.

Lammatina, L., Lezica, R. P., and Conde, R. D. 1985 - Protein metabolism in senescing wheat leaves. Determination of synthesis and degradation rates and their effects on protein loss. *Plant Physiol.* **77**: 587-590.

Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. 1981 - Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 197-214.

Laval-Martin, D. and Mazliak, P. 1979 - *TP et TD de physiologie végétale*, Hermann, Paris.

Lawlor, D. W. 1987 - *Photosynthesis: metabolism, control and physiology*, Longman Scientific and Technical, England.

Lea, P. J. and Miflin, B. J. 1974 - Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**: 614-616.

Lea, P. J., Robinson, S. A. and Stewart, G. R. 1990 - The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine. In: *The biochemistry of plants*, vol. 16, (eds. P. K. Stumpf and E. E. Conn), Academic Press, New York, pp. 121-159.

Lee, T. T. 1977 - Promotion of plant growth and inhibition of enzymic degradation of indole-3-acetic acid by metabolites of carbofuran, a carbamate insecticide. *Can. J. Bot.* **55**: 574-579.

Lehotay, J. and Kisová, D. 1993 - HPLC study of mancozeb degradation on leaves. *J. Liq. Chromatogr.* **16**: 1015-1022.

Leite de Vasconcellos, J. 1936 - *Etnografia portuguesa*, II, p. 85.

Levitt, J. 1962 - A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J. Theoret. Biol.* **3**: 355-391.

Lewis, O. A. M. 1986 - *Plants and nitrogen.* Studies in Biology no.166, Edward Arnold, London.

Li, X.-Z., Larson, D. E., Glibetic, M., and Oaks, A. 1993 - Effects of nitrogen metabolites on the induction of maize nitrate reductase. *Plant Physiol.* **102** (Suppl.): 37 (Abstr. nº194).

Lilley, R. McC. and Walker, D. A. 1974 - An improved spectrophotometric assay for ribulose bisphosphate carboxilase. *Biochim. Biophys. Acta* **358**: 226-229.

Lindsey, K. and Yeoman, M. 1985 - Dynamics of plant cell cultures. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol. 2, (ed. I. Vasil), Academic Press, London, New York, pp. 61-111.

Long, D. M. and Oaks, A. 1990 - Stabilization of nitrate reductase in maize roots by chymostatin. *Plant Physiol.* **93**: 846-850.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Lustinec, J., Hadacová, V., Kamínek, M. and Procházka, Z. 1983 - Quantitative determination of starch, amylose, and amylopectin in plant tissues using glass fiber paper. *Anal. Biochem.* **132**: 265-271.

Mae, T., Kai, N., Makino, A. and Ohira, K. 1984 - Regulation between ribulose bisphosphate carboxylase content and chloroplast.number in naturally senescing primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* **25**: 333-336.

Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. 1983 - Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves. *Plant Physiol.* **73**: 1002-1007.

Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. 1985 - Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves from emergence through senescence. Quantitative analysis by carboxylation/oxygenation and regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate. *Planta* **166**: 414-420.

Mann, A. F., Fentem, P. A. and Stewart, G. R. 1979 - Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**: 515-521.

Mann, A. F., Fentem, P. A. and Stewart, G. R. 1980 - Tissue localization of barley (*Hordeum vulgare*) glutamine synthetase isoenzymes. *FEBS Lett.* **110**: 265-267.

Mares, D. J. and Marschner, H. 1980 - Assimilate conversion in potato tubers in relation to starch deposition and cell growth. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **93**: 299-313.

Mares, D. J., Marschner, H. and Krauss, A. 1981 - Effect of gibberellic acid on growth and carbohydrate metabolism of developing tubers of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* **52**: 267-274.

Mares, D. J., Sowokinos, J. R. and Hawker, J. S. 1985 - Carbohydrate metabolism in developing potato tubers. In: *Potato physiology* (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 279-327.

Marshall, B. and Voss, J. 1991 - The relation between the nitrogen concentration and photosynthetic capacity of potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. *Ann. Bot.* **68**: 33-39.

Martin, H. and Worthing, C. R. 1976 - *Insecticide and fungicide handbook*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Martins, F. M. C. F. 1990 - Estudos de crescimento de batata em condições mediterrânicas. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

Mason-Apps, S., Cummings, W. R. and Filion, W. G. 1990 - The characterization of the heat-shock response in the arctic plant *Saxifraga cernua*. *Can. J. Bot.* **68**: 56-62.

Matile, P., Schellenberg, M. and Peisker, C. 1992 - Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. *Planta* **187**: 230-235.

Matoh, T., Ida, S. and Takahashi, E. 1980 - Citado por Sechley, K. A., Yamaya, T. and Oaks, A. 1992.

Matoh, T., and Takahashi, E. 1981 - Citado por Sechley, K. A., Yamaya, T. and Oaks, A. 1992.

McCauley, M. M. and Evert, R. F. 1989 - Minor veins of the potato (*Solanum tuberosum* L.) leaf: ultrastructure and plasmodesmatal frequency. *Bot. Gaz.* **150**: 351-368.

McNally, S. F., Hirel, B., Gadal, P., Fred Mann, A. and Stewart, G. R. 1983 - Glutamine synthetases of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.* **72**: 22-25.

Mehta, R. A., Fawcett, T. W., Porath, D. and Mattoo, A. K. 1992 - Oxidative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **267**: 2810-2816.

Melchers, G., Sacristán, M. D. and Holder, A. A. 1978 - Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* **43**: 203-218.

Melis, R. J. M. and van Staden, J. 1984 - Tuberization and hormones. *Z. Pflanzenphysiol.* **113**: 271-283.

Melzer, J. M., Kleinhofs, A., and Warner, R. L. 1989 - Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 341-346.

Miflin, B. J. and Lea, P. J. 1976 - The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* **15**: 873-885.

Miflin, B. J. and Lea, P. J. 1977 - Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **5**: 299-329.

Millard, P. 1988 - The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell Environ.* **11**: 1-8.

Millard, P. and Catt, J. W. 1988 - The influence of nitrogen supply on the use of nitrate and ribulose 1,5-*bis*phosphate carboxylase/oxygenase as leaf nitrogen stores for growth of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *J. Exp. Bot.* **39**: 1-11.

Millard, P. and MacKerron, D. K. L. 1986 - The effects of nitrogen application on growth and nitrogen distribution within the potato canopy. *Ann. appl. Biol.* **109**: 427-437.

Millard, P. and Marshall, B. 1986 - Growth, nitrogen uptake and partitioning within the potato (*Solanum tuberosum* L.) crop, in relation to nitrogen application. *J. Agric. Sci.* **107**: 421-429.

Millard, P., Robinson, D. and Mackie-Dawson, L. A. 1989 - Nitrogen partitioning within the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant in relation to nitrogen supply. *Ann. Bot.* **63**: 289-296.

Mitsuhashi, W. and Feller, U. 1992 - Effects of light and external solutes on the catabolism of nuclear-encoded stromal proteins in intact chloroplasts isolated from pea leaves. *Plant Physiol.* **100**: 2100-2105.

Mitten, D. H., Horn, M., Burrel, M. M. and Blundy, K. S. 1990 - In: *The molecular and cellular biology of the potato*, Biotechnology in Agriculture no 3, (eds. M. E. Vayda and W. D. Park), CAB International, UK, pp. 181-191.

Mohabir, G. and John, P. 1988 - Effect of temperature on starch synthesis in potato tuber tissue and in amyloplasts. *Plant Physiol.* **88**: 1222-1228.

Moorby, J. 1978 - The physiology of growth and tuber yield. In: In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), Chapman & Hall, London, pp. 153-194.

Morel, G. and Martin, C. 1955 - Guérison des pommes de terre atteintes de maladie à virus. *C. R. Acad. Agric. Fran.* **41**: 472-475.

Muneta, P., Hagen, S., LeTourneau, D. and Brown, J. 1990 - Effect of temperature on the sugar content of potato callus tissue. *Am. Potato J.* **67**: 209-215.

Muraja-Fras, J., Krsnik-Rasol, M. and Wrischer, M. 1994 - Plastid transformation in greening potato tuber tissue. *J. Plant Physiol.* **144**: 58-63.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962 - A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Müler-Röber, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L. 1992 - Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**: 1229-1238.

Naik, M. S. and Nicholas, D. J. D. 1986 - Malate metabolism and its relation to nitrate assimilation in plants. *Phytochemistry* **25**: 571-576.

Naik, M. S., Abrol, Y. P., Nair, T. V. R. and Ramarao, C. S. 1982 - Nitrate assimilation - its regulation ans relationship to reduced nitrogen in higher plants. *Phytochemistry* **21**: 495-504.

Naik, P. S. and Widholm, J. M. 1993 - Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell, Tiss. & Org. Cult.* **33**: 273-280.

Nakata, P. A., Anderson, J. M. and Okita, W. 1994 - Structure and expression of the potato ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit. *J. Biol. Chem.* **269**: 30798-30807.

Ngernprasirtsiri, J., Takabe, T. and Akazawa, T. 1989 - Immunochemical analysis shows that an ATP/ADP-translocator is associated with the innerenvelope membranes from *Acer pseudoplatanus* L.. *Plant Physiol.* **89**: 1024-1027.

Nieden, U. and Neumann, D. 1978 - Effects of (2-chloroethyl)-trimethyl-ammonium chloride (CCC) on chlorophyll content and ultrastructure of the plastids of *Pisum sativum* L.. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **173**: 202-212.

Nitsch, J. P. and Nitsch, C. 1969 - Haploid plants from polen grains. *Science* **163**: 85-87.

Nock, L. P., Rogers, L. J. and Thomas, H. 1992 - Metabolism of protein and chlorophyll in leaf tissue of *Festuca pratensis* during chloroplast assembly and senescence. *Phytochemistry* **31**: 1465-1470.

Oaks, A. 1992 - A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. *BioScience* **42**: 103-111.

Oaks, A. 1994a - Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* **72**: 739-750.

Oaks, A. 1994b - Efficiency of nitrogen utilization in C_3 and C_4 cereals. *Plant Physiol.* **106**: 407-414.

Oaks, A. and Hirel, B. 1985 - Nitrogen metabolism in roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 345-365.

Obata-Sasamoto, H. and Suzuki, H. 1979 - Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiol. Plant.* **45**: 320-324.

Oelmüller, R. and Briggs, W. R. 1990 - Intact plastids are required for nitrate- and light-induced accumulation of nitrate reductase activity and mRNA in squash cotyledons. *Plant Physiol.* **92**: 434-439.

Oelmüller, R., Schuster, C. and Mohr, H. 1988 - Physiological characterization of a plastidic signal required for nitrate-induced appearance of nitrate and nitrite reductases. *Planta* **174**: 75-83.

Oji, Y., Watanabe, M., Wakiuchi, N. and Okamoto, S. 1985 - nitrite reduction in barley-root plastids: dependence on NADPH coupled with glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases, and possible involvement of an electron carrier and a diaphorase. *Planta* **165**: 85-90.

Okita, T. W. 1992 - Is there an alternative pathway for starch synthesis?. *Plant Physiol.* **100**: 560-564.

Olesinski, A. A., Wolf, S., Rudich, J. and Marani, A. 1989 - The effect of nitrogen fertilization and irrigation frequency on photosynthesis of potatoes (*Solanum tuberosum*). *Ann. Bot.* **64**: 651-657.

Orihuel-Iranzo, B. and Campbell, W. H. 1980 - Development of NAD(P)H: and NADH: nitrate reductase activities in soybean cotyledons. *Plant Physiol.* **65**: 595-599.

Pace, G. M., Volk, R. J. and Jackson, W. A. 1990 - Nitrate reduction in response to CO_2-limited photosynthesis. *Plant Physiol.* **92**: 286-292.

Paiva, E., Lister, R. M. and Park, W. D. 1983 - Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles. *Plant Physiol.* **71**: 161-168.

Pääkkönen, E., Holopainen, T. and Kärenlampi, L. 1995 - ageing-related anatomical and ultrastructural changes inleaves of birch (*Betula pendula* Roth.) clones as affected by low ozone exposure. *Ann. Bot.* **75**: 285-294.

Peferoen, M., Jansens, S., Reynaerts, A. and Leemans, J. 1990 - Potato plants with engineered resistance against insect attack. In: *The molecular and cellular biology of the potato*, Biotechnology in Agriculture no 3, (eds. M. E. Vayda and W. D. Park), CAB International, UK, pp. 193-204.

Pelacho, A. M. and Mingo-Castel, A. M. 1991 - Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* **97**: 1253-1255.

Peñarrubia, L. and Moreno, J. 1990 - Increased susceptibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase/oxygenase to proteolytic degradation caused by oxidative treatments. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**: 319-323.

Pereira, S., Carvalho, H., Sunkel, C. and Salema, R. 1992 - Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll anf phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L.. *Protoplasma* **167**: 66-73.

Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. J., Parker, G. B., McPherson, S. A., Wymann, J., Love, S., Reed, G., Biever, D. and Fischhoff, D. A. 1993 - Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* **22**: 313-321.

Peterson, G. L. 1977 - A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356.

Peterson, R. L., Barker, W. G. and Howarth, M. J. 1985 - Development and structure of tubers. In: *Potato physiology* (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 123-152.

Pettersson, O. 1992 - Pesticides, valuations and politics. *J. Agric. Environm. Ethics*, Discussion Note, pp. 103-106.

Pinta, M. 1980 - *Spectrométrie d'absorption atomique*, 2ème ed, Masson, Paris.

Plaisted, P. H. 1957 - Growth of the potato tuber. *Plant Physiol.* **32**: 445-453.

Pless, C. D., Cherry, T. E. and Morgan Jr. H. 1971 - Growth and yield of burley tobacco as affected by two systemic insecticides. *J. Econ. Entomol.* **64**: 172-175.

Portas, C. M. 1983 - Potato crop in Portugal. Prospective situation and utilization and challenge of agricultural systems of northem coastal areas. In: *Research for the potato in the year 2000*, CIP, Lima, pp. 150-151.

Pozueto-Romero, J., Ardila, F. and Akazawa, T. 1991a - ADP-glucose transport by the chloroplast adenylate translocator is linked to starch biosynthesis. *Plant Physiol.* **97**: 1565-1572.

Pozueto-Romero, J., Frehner, M., Viale, A. M. and Akazawa, T. 1991b - Direct transport of ADP-glucose by an adenylate translocator is linked to starch biosynthesis in amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5769-5773.

Preiss, P. 1982 - Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**: 419-458.

Preiss, P. 1988 - Biosynthesis of starch and its regulation. In: *The biochemistry of plants*, vol.14, (ed. J. Preiss), Academic Press, New York, pp. 181-254.

Protacio, C. M. and Flores, H. E. 1992 - The role of polyamines in potato tuber formation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28**: 81-86.

Quick, W. P., Schurr, U., Fichtner, K., Schulze, E.-D., Rodermel, S. R., Bogorad, L. and Stitt, M. 1991a - The impact of decreased Rubisco on photosynthesis, growth, allocation and storage in tobacco plants which have been transformed with antisense *rbcS*. *Plant J.* **1**: 51-58.

Quick, W. P., Schurr, U., Scheibe, R., Schulze, E.-D., Rodermel, S. R., Bogorad, L. and Stitt, M. 1991b - Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" rbcS. *Planta* **183**: 542-554.

Quraishi, A. 1985 - Tissue culture studies as a means for exploring variability in potato. *Pakistan J. Agric. Res.* **6**: 20-22.

Rageb, A. F. M. and Wilcockson, S. J. 1995 - Factors affecting tuber dry matter content. Abstr. of Papers Conf. EAPR, Vila Real 24-30 Jun 1995: 40-41.

Rajasekhar, V. K., Gowri, G. and Campbell, W. H. 1988 - Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. *Plant Physiol.* **88**: 242-244.

Raman, K. V. and Radcliffe, E. B. 1992 - Pest aspects of potato production. Part 2. Insect pests. In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), 2nd ed, Chapman & Hall, London, pp. 476-506.

Rastogi, R., Back, E., Schneiderbauer, A., Bowsher, C. G., Mofatt, B. and Rothstein, S. J. 1993 - A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. *Plant J.* **4**: 317-326.

Rawn, J. D. 1989 - Photosynthesis. In: *Biochemistry*, Neil Patterson Publ., Carolina Biological Supply Comp., Burlington, North Carolina, pp. 489-532.

Redinbaugh, M. G. and Campbell, W. H. 1981 - Purification and characterization of NAD(P)H: nitrate reductase and NADH: nitrate reductase from corn roots. *Plant Physiol.* **68**: 115-120.

Redinbaugh, M. G. and Campbell, W. H. 1993 - Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiol.* **101**: 1249-1255.

Reeve, R. M., Hautala, E. and Weaver, M. L. 1969 - Anatomy and compositional variation within potatoes. I. Developmental histology of the tuber. *Am. Potato J.* **46**: 361-373.

Reeve, R. M., Timm, H. and Weaver, M. L. 1973a - Parenchyma cell growth in potato tubers. I. Different tuber regions. *Am. Potato J.* **50**: 49-57.

Reeve, R. M., Timm, H. and Weaver, M. L. 1973b - Parenchyma cell growth in potato tubers. II. Cell divisions vs. cell enlargement. *Am. Potato J.* **50**: 71-78.

Remmler, J. L. and Campbell, W. H. 1986 - Regulation of corn leaf nitrate reductase. *Plant Physiol.* **80**: 442-447.

Reynolds, E. 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212.

Rich, A. E. 1983 - *Potato diseases*, Academic Press, London.

Riens, B. and Heldt, H. W. 1992 - Decrease of nitrate reductase activity in spinach leaves during a light-dark transition. *Plant Physiol.* **98**: 573-577.

Ristic, Z. and Cass, D. D. 1991 - Chloroplast structure after water shortage and high temperature in two lines of *Zea mays* L. that differ in drought resistance. *Bot. Gaz.* **152**: 186-194.

Robin, P., Conejero, G., Tranchant, J.-P., Passama, L. and Salsac, L. 1983 - Mesure de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes. *Physiol. Vég.* **21**: 123-128.

Robinson, S. A., Slade, A. P., Fox, G. G., Phillips, R., Ratcliffe, R. G. and Stewart, G. R. 1991 - The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* **95**: 509-516.

Robinson, S. A., Stewart, G. R. and Phillips, R. 1992 - Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **98**: 1190-1195.

Ross, H. A., Davies, H. V., Burch, L. R., Viola, R. and McRae, D. 1994 - Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* **90**: 748-756.

Runge, M. 1983 - Physiology and ecology of nitrogen nutrition. In: *Encyclopedia of plant physiology*, vol. 12C, (eds. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond and H. Ziegler), Springer-Verlag, Berlin, pp. 163-200.

Ruzo, L. and Cazida, J. E. 1979 - Degradation of decamethrin on cotton plants. *J. Agric. Food Chem.* **27**: 572-575.

Sage, R. F. and Pearcy, R. W. 1987 - The nitrogen use efficiency of C_3 and C_4 plants. *Plant Physiol.* **84**: 954-958.

Salaman, R. N. 1937 - Citado por Hawkes, J. G. 1992.

Salema, R. 1969 - Amido - Estudo ultraestrutural da sua biogénese em plantas superiores. *Broteria* **38**: 1-111.

Salema, R. and Brandão, I. 1973 - The use of PIPES buffer in the fixation of plant cell for electron microscopy. *J. Submicr. Cytol.* **5**: 79-96.

Salisbury, F. B. and Ross, C. W. 1985 - *Plant physiology*, 3rd ed, Wadsworth Publishing Comp., Belmont, California.

Samoucha, Y., Baider, A., Cohen, Y. and Gisi, U. 1993 - Control of late blight in potato by full and reduced rates of oxadixil mixtures. *Phytoparasitica* **21**: 69-73.

Santakumari, M. and Berkowitz, G. A. 1991 - Chloroplast volume: cell water potential relationships and acclimation of photosynthesis toleaf water deficits. *Photosynth. Res.* **28**: 9-20.

Santos, I. and Salema, R. 1983 - Stereological study of the variation of chloroplast tubules and volume in the CAM plant *Sedum telephium*. *Z. Pflanzenphysiol.* **113**: 29-37.

Schuster, C. and Mohr, H. 1990 - Photooxidative damage to plastids affects the abundance of nitrate-reductase mRNA in mustard cotyledons. *Planta* **181**: 125-128.

Sechley, K. A., Oaks, A. and Bewley, J. D. 1991 - Enzymes of nitrogen assimilation undergo seasonal fluctuations in the roots of the persistent weedy perennial *Cichorium intybus*. *Plant Physiol.* **97**: 322-329.

Sechley, K. A., Yamaya, T. and Oaks, A. 1992 - Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **134**: 85-163.

Secor, J., Shibles, R. and Stewart, C. R. 1984 - A metabolic comparison between progressive and monocarpic senescence of soybean. *Can. J. Bot.* **62**: 806-811.

Sharma, K. K. 1992 - Control of potato late blight with systemic and contact fungicidal mixtures in north west Indian plains. *J. Indian Potato Assoc.* **19**: 75-76.

Shaw, R., Varns, J. L., Miller, K. A. and Talley, E. A. 1976 - Potato tuber callus. Validation as biochemical tool. *Plant Physiol.* **58**: 464-467.

Shen, T.-C., Funkhouser, E. A. and Guerrero, M. G. 1976 - NADH- and NAD(P)H-nitrate reductases in rice seedlings. *Plant Physiol.* **58**: 292-294.

Shepard, J. F. 1982 - The regeneration of potato plants from leaf-cell protoplasts. *Sci. Am.* **246**: 154-167.

Shepard, J. F., Bidney, D. and Shahin, E. 1980 - Potato protoplasts in crop improvement. *Science* **208**: 17-24.

Shinozaki, K. and Sugiura, N. 1982 - Citado por Enyedi, A. J., Nancy, A. E. and Pell, E. J. 1992.

Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J. and Rufty, Jr. T. W. 1990 - Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}NO_3^-$ influx. *Plant Physiol.* **93**: 1426-1432.

Singh, M. and Mersie, W. 1993 - Metalaxyl toxicity to citrus with or without herbicides. *Weed Technol.* **7**: 511-514.

Sivasankar, S. and Oaks, A. 1994 - Regulation of maize nitrate reductase by nitrogen and carbon metabolites. *Plant Physiol.* **105** (Suppl.): 40 (Abstr. nº166).

Smith, A. M., Denyer, K. and Martin, C. R. 1995 - What controls the amount and structure of starch in storage organs?. *Plant Physiol.* **107**: 673-677.

Smith, C. J. 1993 - Carbohydrate chemistry. In: *Plant biochemistry and molecular biology*, (eds. P. J. Lea and R. C. Leegood), John Wiley & Sons, Chichester, pp. 73-111.

Smith, O. E. and Palmer, C. E. 1970 - Cytokinin-induced tuber formation on stolons of *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* **23**: 599-606.

Snyder, R. G. and Ewing, E. E. 1989 - Interactive effects of temperature, photoperiod, and cultivar on tuberization of potato cuttings. *HortScience* **24**: 336-338.

Soares, M. I. M., Lips, S. H. and Cresswell, C. F. 1985 - Endogenous nitrate loss as an assay for nitrate reduction in vivo. *Physiol. Plant.* **64**: 487-491.

Somda, Z. C., Mills, H. A. and Phatak, S. C. 1990 - Growth and elemental composition of tomato as affected by fungicides and nitrogen sources. *J. Plant Nutr.* **13**: 1167-1177.

Somers, D. A., Kuo, T.-M., Kleinhofs, A., Warner, R. L. and Oaks, A. 1983 - Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiol.* **72**: 949-952.

Somerville, C. R. and Ogren, W. L. 1980 - Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**: 257-259.

Sonnewald, U. and Willmitzer, L. 1992 - Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiol.* **99**: 1267-1270.

Soussana, J. F., Gojon, A., Passama, L., Wakrim, R. and Robin, P. 1989 - Critical evaluation of the *in situ* nitrate reductase assay. *Plant and Soil* **120**: 243-251.

Sowokinos, J. R. 1976 - Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. I. Changes in ADP-glucose and UDP-glucose pyrophosphorylase activities associated with starch biosynthesis during tuberization, maturation, and storage of potatoes. *Plant Physiol.* **57**: 63-68.

Sowokinos, J. R. and Preiss, J. 1982 - Pyrophosphorylase on *Solanum tuberosum*. III. Purification, physical, and catalytic properties of ADPglucose pyrophosphorylase in potatoes. *Plant Physiol.* **69**: 1459-1466.

Sree Ramulu, K., Dijkhuis, P. and Roest, S. 1983 - Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). *Theor. Appl. Genet.* **65**: 329-338.

Stallknecht, G. F. 1985 - Tuber initiation in *Solanum tuberosum*: effect of phytohormones and induced changes in nucleic acid and protein metabolism. In: *Potato physiology* (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 231-260.

Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., Preiss, J. and Kishore, G. M. 1992 - Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPG glucose pyrophosphorylase. *Science* **258**: 287-292.

Stark, Z., Wazynska, Z. Kucewicz, O. 1993 - Comparative effects of heat stress on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tomato plants with source-sink modulated by growth regulators. *Acta Physiol. Plant.* **15**: 125-133.

Stienstra, A. W. 1986 - Nitrate accumulation and growth of *Aster tripolium* L. with a continuos and intermittent nitrogen supply. *Plant Cell Environ.* **9**: 307-313.

Stitt, M. 1990 - Frutose-2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 153-185.

Stoddart, J. L. and Thomas, H. 1982 - Leaf senescence. In: *Encyclopedia of plant physiology*, vol. 14A, (eds. D. Boulter and B. Parthier), Springer-Verlag, Berlin, pp. 592-636.

Storey, R. M. J. and Davies, H. V. 1992 - Tuber quality. In: *The potato crop - the scientific basis for improvement*, (ed. P. M. Harris), 2nd ed, Chapman & Hall, London, pp. 507-569.

Streit, L. and Feller, U. 1982 - Changing activities of nitrogen-assimilating enzymes during growth and senescence of dwarf beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* 108: 273-281.

Streit, L., Martin, B. and Harper, J. E. 1987 - A method for the separation and partial purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-type soybean leaves. *Plant Physiol.* **84**: 654-657.

Sugiyama, T., Nakayama, N., Ogawa, M. and Akazawa, T. 1968 - Structure and function of chloroplast proteins: effect of *p*-chloromecuribenzoate treatment on the ribulose-1,5-diphosphate carboxilase activity of spinach leaf fraction 1 protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**: 98-106.

Sung, S.-J. S., Xu, D.-P. and Black, C. C. 1989 - Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiol.* **89**: 1117-1121.

Suzuki, A. and Gadal, P. 1982 - Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiol.* **69**: 848-852.

Suzuki, A., Audet, C. and Oaks, A. 1987a - Influence of light on the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaves. *Plant Physiol.* **84**: 578-581.

Suzuki, A., Carrayol, E., Zehnacker, C. and Deroche, M.-E. 1988 - Glutamate synthase in *Medicato sativa* L. occurrence and properties of Fd-dependent enzyme in plant cell fraction during root nodule development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**: 1130-1138.

Suzuki, A., Gadal, P. and Oaks, A. 1981 - Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta* **151**: 457-461.

Suzuki, A., Jacquot, J.-P. and Gadal, P. 1983 - Glutamate synthase in rice roots. Studies on the electron donor specificity. *Phytochemistry* **22**: 1543-1546.

Suzuki, A., Vidal, J. and Gadal, P. 1982 - Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies of enzymes in green leaf, etiolated leaf, and root tissues. *Plant Physiol.* **70**: 827-832.

Suzuki, A., Vidal, J., Nguyen, J. and Gadal, P. 1984 - Occurrence of ferredoxin-dependent glutamate synthase in plant cell fraction of soybean root nodules (*Glycine max*). *FEBS Lett.* **173**: 204-208.

Suzuki, S., Nakamoto, H., Ku, M. S. B. and Edwards, G. E. 1987b - Influence of leaf age on photosynthesis, enzyme activity, and metabolite levels in wheat. *Plant Physiol.* **84**: 1244-1248.

Taiz, L. and Zeiger, E. 1991 - *Plant physiology*, The Benjamin/Cumings Publishing Comp., Redwood City, California.

Takabe, T. and Akazawa, T. 1975 - The role of sulfhydryl groups in the ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase and oxygenase reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **169**: 686-694.

Takahashi, K., Fujino, K., Kikuta, Y. and Koda, Y. 1994 - Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* **100**: 3-8.

Tavazza, R., Ordás, R. J. and Ancora, G. 1988 - Procedure for the regeneration of plants from cell suspension protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Desirée. *Plant Sci.* **58**: 223-230.

Taylor, D. M., Morgan, P. W., Joham, H. E. and Amin, J. V. 1968 - Influence of substrate and tissue manganese on the IAA-oxidase system in cotton. *Plant Physiol.* **43**: 243-247.

Tingey, S. V., Walker, E. L. and Coruzzi, G. M. 1987 - Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* **6**: 1-9.

Tobin, A. K., Ridley, S. M. and Stewart, G. R. 1985 - Changes in the activities of chloroplast and cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat. *Planta* **163**: 544-548.

Tsay, Y.-F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A. and Crawford, N. M. 1993 - The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**: 705-713.

Turgeon, R. 1989 - The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 119-138.

Tyson, R. H. and ap Rees, T. 1988 - Starch synthesis by isolated amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* **175**: 33-38

Valentine, R. C. 1965 - Citado por Salema, R. 1969.

Valluri, J. V., Castillon, J., Newton, R. J. and Soltes, E. 1989 - Water stress-induced changes in protein synthesis of slash pine hypocotyls. *J. Plant Physiol.* **135**: 355-360.

van Emden, H. F. 1989 - *Pest control*. New Studies in Biology, 2nd ed, Edward Arnold, London.

Vaughn, K. C. and Campbell, W. H. 1988 - Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* **88**: 1354-1357.

Vayda, M. E. and Belknap, W. R. 1992 - The emergence of transgenic potatoes as commercial products and tools for basic science. *Transgenic Res.* **1**: 149-163.

Vega, J. M., Cárdenas, J. and Losada, M. 1980 - Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods in Enzymology* **69**: 255-270.

Vézina, L.-P., Hope, H. J. and Joy, K. W. 1987 - Isoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum* L. cv Little Marvel) and alfalfa (*Medicago media* Pers. cv Saranac). *Plant Physiol.* **83**: 58-62.

Vézina, L.-P. and Langlois, J. R. 1989 - Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Plant Physiol.* **90**: 1129-1133.

Vincentz, M., Moureaux, T., Leydecker, M.-T., Vaucheret, H. and Caboche, M. 1993 - Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* **3**: 315-324.

Viola, R., Davies, H. V. and Chudeck, A. R. 1991 - Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). *Planta* **183**: 202-208.

Vos, J. and Biemond, H. 1992 - Effects of nitrogen on the development and growth of the potato plant. 1. Leaf appearance, expansion growth, life spans of leaves and stem branching. *Ann. Bot.* **70**: 27-35.

Vreugdenhil, D. and Struik. P. C. 1989 - An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* **75**: 525-531.

Vreugdenhil, D. and van Dijk, W. 1989 - Effects of ethylene on the tuberization of potato (*Solanum tuberosum*) cuttings. *Plant Growth Regulation* **8**: 31-39.

Wallsgrove, R. M., Lea, P. J. and Miflin, B. J. 1982 - The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* **154**: 473-476.

Wallsgrove, R. M., Turner, J. C., Hall, N. P., Kendall, A. C. and Bright, S. W. J. 1987 - Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase - biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol.* **83**: 155-158.

Wang, P. and Hu, C. 1985 - Potato tissue culture and its applications in agriculture. In: *Potato physiology* (ed. P. H. Li), Academic Press, London, pp. 503-577.

Ward, M. R., Tischner, R. and Huffaker, R. 1988 - Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings. *Plant Physiol.* **88**: 1141-1145.

Wardley, T. M., Bhalla, P. L. and Dalling, M. J. 1984 - Changes in the number and composition of chloroplasts during senescence of mesophyll cells of attached and detached primary leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **75**: 421-424.

Warner, R. L., Narayanan, K. R. and Kleinhofs, A. 1987 - Inheritance and expression of NAD(P)H nitrate reductase in barley. *Theor. Appl. Genet.* **74**: 714-717.

Wheeler, V. A., Evans, N. E., Foulger, D., Webb, K. J., Karp, A., Franklin, J. and Bright, S. W. J. 1985 - Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants. *Ann. Bot.* **55**: 309-320.

Wiegand-Rosinus, M., Obst, U., Haberer, K. and Wild, A. 1992 - Enzymes *in vitro* as indicators for pesticides: an examination. *Environm. Toxicol. and Water Qual.: An Intern. J.* **7**: 313-321.

Wild, A. and Ziegler, C. 1989 - The effect of bialaphos on ammonium-assimilation and photosynthesis. I. Effect on the enzymes of ammonium-assimilation. *Z. Naturforsch.* **44c**: 97-102.

Wittenbach, V. A., Lin, W. and Hebert, R. R. 1982 - Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol.* **69**: 98-102.

Wolf, S. 1993 - Effect of leaf age on photosynthesis, carbon transport and carbon allocation in potato plants. *Potato Res.* **36**: 253-262.

Wolf, S., Marani, A. and Rudich, J. 1990a - Effects of temperature and photoperiod on assimilate partitioning in potato plants. *Ann. Bot.* **66**: 513-520.

Wolf, S., Olesinski, A. A., Rudich, J. and Marani, A. 1990b - Effect of high temperature on photosynthesis in potatoes. *Ann. Bot.* **65**: 179-185.

Woo, K. C. and Canvin, D. T. 1980 - The role of malate in nitrate reduction in spinach leaves. *Can. J. Bot.* **58**: 517-521.

Worrell, A. C., Bruneau, J.-M., Summerfelt, K., Boersig, M. and Voelker, T. A. 1991 - Expression of a maize sucrose-phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* **3**: 1121-1130

Yamaya, T., Hayakawa, T., Tanasawa,K., Kamachi, L., Mae, T. and Ojima, K. 1992 - Tissue distribution of glutamate synthase and glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol.* **100**: 1427-1432.

Yemm, E. W. and Cocking, E. C. 1955 - The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst* **80**: 209-213.

Yeoman, M. and Aitchison, P. 1973 - Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: *Plant tissue and cell culture*, Botanical Monographs, vol. 11, (ed. H. Street), Blackwell, Oxford, pp. 240-268.

Yeoman, M. M. 1973 - Tissue (callus) cultures-techniques. In: *Plant tissue and cell culture*, Botanical Monographs, vol. 11, (ed. H. Street), Blackwell, Oxford, pp. 31-58.

Yoshihara, T., Omer, E.-S. A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y. and Koda, Y. 1989 - Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2835-2837.

Zhu, Y. S., Merkle-Lehman, D. L. and Kung, S. D. 1984 - Light-induced transformation of amyloplasts into chloroplasts in potato tubers. *Plant Physiol.* **75**: 142-145.

Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. and Sonnewald, U. 1995 - Evidence of hte crucial role of sucrose synthase for sink strenght using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **7**: 97-107.