

MARILICE CHAPPER

**METABOLISMO DO ADOÇAMENTO EM BATATA
ARMAZENADA A 2°C E 15°C**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

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

T

C467m
2003

Chapper, Marilice, 1962-

Metabolismo do adoçamento em batata armazenada a
2 °C e 15 °C / Marilice Chapper. – Viçosa : UFV, 2003.
68p. : il.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Batata - Carboidratos - Efeito da temperatura. 2.
Batata - Atividade enzimática. 3. Batata - Fisiologia -
Efeito da temperatura. 4. Batata - Armazenamento I.
Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 19.ed. 581.133

CDD 20.ed. 581.133

MARILICE CHAPPER

**METABOLISMO DO ADOÇAMENTO EM BATATA
ARMAZENADA A 2°C E 15°C**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 09 de dezembro de 2003

Prof. Fernando Luiz Finger
(Conselheiro)

Prof. Luiz Carlos C. Salomão

Prof. Mário Puiatti

Prof. Paulo Roberto Mosquim

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Orientador)

*A Edemora Pinto
In Memoriam*

AGRADECIMENTOS

Às Universidades Federais de Pelotas e de Viçosa, pela oportunidade de realização deste Curso.

Ao Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, pela possibilidade de realização deste Curso.

Aos Professores Marcos Antonio Bacarin e Arione da Silva Pereira, que apesar da distância, mantiveram-se atenciosos e amigos em todos os momentos.

Aos Professores Fernando Luiz Finger, Marcelo Ehlers Loureiro e Marco Aurélio Pedron e Silva, pela orientação e amizade prestada ao longo de todo Curso.

À Coordenação do Curso de Fisiologia Vegetal, Professor Rolf Puschmann, pela colaboração e amizade dispensadas.

À CAPES, que através do PICDT, fomentou a realização deste curso.

A todos colegas de Curso que me apoiaram em todos os momentos e tornaram o convívio mais alegre.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal por toda colaboração prestada durante todo o Curso.

E em especial, ao Professor Paulo Roberto Mosquim, pela orientação e conhecimentos, e principalmente, pela maneira gentil e polida de tratar a todos, o que o torna uma pessoa querida e admirada.

BIOGRAFIA

MARILICE CHAPPER, nasceu em Pelotas, Rio Grande do Sul, em 30 de janeiro de 1962.

Em janeiro de 1983, graduou-se em Biologia Licenciatura plena, pela Universidade Católica de Pelotas.

Em 1997, foi efetivada como Professora de Biologia no Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça da Universidade Federal de Pelotas.

Em 2000, concluiu o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Pelotas e, em 2001, iniciou o Curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	01
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	56

RESUMO

CHAPPER, Marilice, D.S. Universidade Federal de Viçosa, dezembro, 2003.

Metabolismo do adoçamento em Batata Armazenada a 2°C E 15°C.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Conselheiros: Fernando Luiz Finger e Marco Aurélio Pedron e Silva.

O armazenamento dos tubérculos de batata sob baixas temperaturas é freqüentemente usado para inibir a brotação, reduzir a infecção por microorganismos e diminuir a perda da massa fresca. Porém, resulta em incrementos nos níveis de açúcares solúveis totais que os tornam impróprios ao processamento industrial. O recondicionamento dos tubérculos em condições de temperatura próxima à do ambiente pode reverter o adoçamento em alguns genótipos. Todavia, até o momento, pouca caracterização fisiológica das respostas de variedades brasileiras a esses tratamentos foi realizada. O objetivo desse trabalho foi verificar o efeito das baixas temperaturas de armazenamento e recondicionamento sobre o metabolismo de carboidratos em três variedades de batata, com respostas contrastantes ao adoçamento. Imediatamente após a colheita, os tubérculos foram armazenados por 30 dias sob duas temperaturas (15°C e 2°C) e seu metabolismo foi analisado em amostras de tubérculos com 0, 3, 7, 10, 20 e 30 dias de armazenamento sob ambas temperaturas. Sob baixa temperatura, os teores de amido diminuem em todas as variedades, sendo observadas maiores reduções na cultivar Atlantic. Esta redução foi associada a um aumento na atividade total das amilases observada nas mesmas condições, ao passo que não foi possível observar alterações significativas na atividade da fosforilase do amido. Estes resultados sugerem que a atividade amidolítica é a principal atividade degradativa do amido em tubérculos de batata das variedades estudadas. Paralelamente

teores de sacarose e glicose são incrementados após exposição dos tubérculos à baixa temperatura. Menores aumentos nos teores de glicose foram observados na variedade Pérola, a qual também apresentou os menores incrementos na atividade da amilase. Estes resultados sugerem que a degradação de amido pelas amilases pode ser um importante fator determinante do adoçamento. Diferenças no padrão de atividade de isoenzimas de amilase foram observadas sob baixas temperaturas em diferentes variedades, mas essas diferenças não puderam ser associadas com níveis de atividade amidolítica ou de degradação de amido. Uma significativa redução na taxa respiratória foi observada durante os primeiros dias durante o armazenamento a baixa temperatura, o qual foi seguido de um posterior aumento e redução, possuindo estas alterações um padrão semelhante em todas as variedades analisadas. O aumento temporário na respiração foi paralelo a um aumento nos teores de açúcares solúveis. Estes resultados sugerem que diferenças nas taxas respiratórias não contribuem para determinar o nível de adoçamento. As variedades diferiram entre si quanto a suas alterações nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis, as quais também variaram de acordo com o tempo de armazenamento. Entretanto não se pode detectar nenhuma possível associação entre as diferenças no metabolismo do nitrogênio com o adoçamento. O acondicionamento dos tubérculos a 15°C esteve associado a uma redução na degradação do amido e no nível de glicose (exceto para a cultivar Eliza) e sacarose, e à uma redução na atividade da sintase da sacarose e da sintase da sacarose-fosfato. A redução na atividade da invertase foi observada após o terceiro dia de acondicionamento, mas apresentou aumento no décimo dia. O acondicionamento dos tubérculos foi eficiente na redução do adoçamento das variedades Atlantic e Pérola. É possível que a redução do adoçamento na cultivar Eliza necessite de um acondicionamento a maiores temperaturas. De qualquer forma, os resultados sugerem que o acondicionamento pode melhorar a qualidade da batata para a fritura após o seu adoçamento.

ABSTRACT

CHAPPER, Marilice, D.S. Universidade Federal de Viçosa, December, 2003.

Metabolism of sweetening in Potato Tubers storage at 2°C and 15°C.

Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Committee members: Fernando Luiz Finger and Marco Aurélio Pedron e Silva.

Storage of potato tubers at low temperatures is frequently used to inhibit the sprouting, to reduce the infection from microorganisms and loss of the fresh weight. However, results in increments in the levels of total soluble sugars which in turn make them inappropriate industrial processing. Reconditioning of cold stored tubers at higher temperatures could be used in order to reduce the high contents of sugars resulting of storage at low temperatures. Until the moment, no detailed physiological characterization of the responses of Brazilian potato varieties to these treatments was performed. The objective of this work was to verify the effect of the low storage temperatures and reconditioning on the carbohydrates metabolism in three potato varieties. Under low temperature, decrease in starch content was observed in all genotypes, being the strongest decrease observed in Atlantic. This reduction was associated with increase in amylase total activity, in contrast to no changed levels of starch phosphorylase activity. This results suggest that amilolytic activity is the major enzymatic step associated to starch degradation in the tubers of these genotypes analysed. Lower temperature was also associated to increases in the levels of sucrose and glucose. However, lower levels of increase in glucose content was observed for Perola, which also have the lowest increase in amylase activity. This results suggest that degradation of starch by amylases could be an important factor determining cold sweetening. Differences in the amylase isoenzymes were detected under cold storage, but this change could be not

associate with differences in levels of amylolytic activity or starch degradation. Temporary, but strong reduction in tuber respiratory rate after 3 days under low temperature, which was followed by further increase, which could be associated with the increase levels of soluble sugars. The pattern of these changes was similar for all genotypes analyzed. These results suggest that respiratory rate have no important role in determining the levels of cold sweetening. All genotypes have shown changes in the levels of soluble proteins, aminoacids and glutamine synthase activity during cold storage, but these changes could not be associated with different levels of cold sweetening. Tuber reconditioning at 15°C was associated with a general reduction in starch degradation activity, glucose content and activities of SuSy and SPS. However, the glucose content was not changed after 20 days of reconditioning. Reduction of invertase activity in cold stored tubers was reverted after 20 days at 15°C. These results shown that reconditioning at 15°C was effective to reduce cold sweetening in Atlantic and Perola varieties. However, the possibility that reconditioning could be effective also with Elysa variety at higher temperatures can not be excluded. The procedure of post-harvest reconditioning could be suggested to be adopted in order to improve the quality of potato tubers to produce potato chips, at least for some genotypes.

INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) pertence à família das Solanáceas, cuja principal subespécie cultivada no país é a *Solanum tuberosum tuberosum* (LOPES, 1997). Embora originária da região andina, sua introdução ocorreu na região sul do Brasil por imigrantes europeus no final do século XIX. Atualmente, esta região é responsável pela metade da produção brasileira, onde são feitos dois cultivos anuais, na primavera e no outono (PEREIRA & CAMPOS, 1999).

A cultura da batata nos últimos anos tem sido alvo de preocupação, tanto pela qualidade, quanto pela produtividade. A qualidade é de fundamental importância para o processamento industrial, seja em nível de congelamento, resfriamento ou de fritura tipo “chips” ou à francesa (MELO, 1999). Atualmente as dificuldades no armazenamento doméstico, descascamento, fritura ou cozimento tem levado alguns países a aumentar a sua industrialização. Entretanto, não existe ainda no mercado variedade nacional de batata de uso específico para processamento industrial (DUPLESSIS *et al.*, 1996).

O armazenamento dos tubérculos de batata a baixas temperaturas é freqüentemente usado para inibir a brotação, reduzir a infecção por microorganismos e diminuir a perda da massa fresca (BURTON, 1982), porém, quando a temperatura é inferior a 8°C, resulta em incrementos nos níveis de açúcares solúveis totais que os tornam impróprios à fritura (VLIET & van SCHRIEMER, 1960; BURTON, 1989). Os açúcares redutores, glicose e frutose, combinam-se com os grupos α -amino dos aminoácidos em altas temperaturas (reação de Maillard), resultando num produto com coloração mais escura e sabor mais amargo logo, de baixa qualidade e aceitação comercial.

No Brasil não é realizado, em escala comercial, o armazenamento controlado de tubérculos de batata sob baixas temperaturas, em virtude de condições econômicas, logísticas e de infra-estrutura inadequadas. Normalmente, o armazenamento dos tubérculos é feito pelo produtor, para obtenção de melhores preços. Porém, durante o armazenamento no período do inverno, nas principais regiões produtoras do sul do Brasil, os tubérculos são

submetidos a baixas temperaturas. Esta exposição ao frio, torna as batatas impróprias à industrialização, devido ao acúmulo de hexoses.

Quando os tubérculos de batata são submetidos a temperaturas iguais ou inferiores a 5°C, o amido é degradado e convertido em açúcares simples (ISHERWOOD, 1973). O acúmulo de açúcares, sob essa temperatura, começa em cerca de dois a quatro dias de armazenamento (ISHERWOOD 1973; CLAASSEN *et al.*, 1993) e está associado principalmente, com aumentos nos teores de sacarose (HILL *et al.*, 1996).

Esses incrementos nos teores de açúcares podem estar associados a aumentos na atividade de algumas enzimas degradativas do amido (SOWOKINOS *et al.*, 1985; COCHRANE *et al.*, 1991; CLAASEN *et al.*, 1993; COTTRELL *et al.*, 1993); aumento na concentração de hexoses-fosfato, como resultado da instabilidade ao frio de enzimas glicolíticas (POLLOCK e ap REES, 1975; DIXON e ap REES, 1980; TREVANION e KRUGER, 1991); aumentos nas atividades de enzimas envolvidas na síntese da sacarose (SOWOKINOS, 1990) e aumento da atividade das invertases.

O amido pode ser degradado por diferentes enzimas, como as amilases e fosforilase do amido. A fosforilase do amido catalisa uma reação reversível onde a glicose-1-fosfato (G₁P) é liberada de uma cadeia de glicana, pela incorporação do fosfato inorgânico na última molécula de glicose presente no final não redutor da molécula. Como o produto da degradação (G₁P) está presente em baixas concentrações nos amiloplastos, o equilíbrio da reação é deslocado em direção à síntese de glicose-1-fosfato (G₁P) (PREISS e LEVI, 1980; STEUP, 1988). Quando DUWENIG *et al.* (1997) reduziram a expressão da isoforma citossólica da fosforilase do amido a níveis não detectáveis, em plantas transgênicas de tubérculos de batata, verificaram que não houve alteração na mobilização do amido. Por outro lado, quando reduziram a expressão da isoforma plastídica, em tubérculos de batata, usando tecnologia antisense, observaram que ocorreu uma variação na estrutura do amido e que a molécula de amilopectina desses tubérculos apresentava uma maior proporção de cadeias curtas de glicose do que o controle não transformado. Desta forma, os autores concluíram que em batata, a fosforilase do amido está

envolvida no alongamento de glicanas específicas da molécula de amilopectina. Por outro lado, os estudos de SMITH e DENYER (1992) e ZEEMAN (1998a), sugeriram que é possível que essas enzimas degradem o amido, produzindo oligossacarídeos de baixos pesos moleculares os quais serão utilizados pelas sintases do amido. Em dois variedades de batata, armazenados a baixas temperaturas CLAASSEN *et al.* (1993), verificaram aumentos na atividade da fosforilase do amido, bem como interações entre a atividade desta enzima com diferentes temperaturas, com a duração do armazenamento e com o acúmulo de açúcares solúveis.

Quanto à via amidolítica (α e β -amilases), sabe-se que as α -amilases são enzimas endoamidolíticas com capacidade de quebrar ligações α -1,4 das moléculas de amilose e amilopectina, numa reação hidrolítica com liberação de glicanas de no mínimo duas unidades de glicose. Foram encontradas diferenças entre as propriedades das α -amilases de diferentes espécies e entre variedades de uma mesma espécie (MACGREGOR, 1983). Em muitas espécies parece haver uma família de genes das α -amilases. Por exemplo, em batata foram isolados cinco cDNAs para proteínas das α -amilases (GAUSING e KREIBERG, 1989).

É possível que a multiplicidade das α -amilases encontradas tenham diferentes funções nos tecidos vegetais, ou por serem expressas diferencialmente, tanto de forma temporal quanto espacial, ou por produzirem enzimas com diferentes propriedades catalíticas. Por exemplo, uma α -amilase produzida no início da germinação em sementes de trigo tem a capacidade de degradar polissacarídeos insolúveis, enquanto a isoenzima que aparece posteriormente só consegue degradar carboidratos solúveis (SARGEANT, 1979). Ao contrário das α -amilases, as β -amilases são exoamidolíticas e liberam resíduos de maltose progressivamente a partir do final não redutor de cadeias de glicose da amilose e amilopectina até elas alcançarem uma ramificação α -1, 6, após a qual nenhuma degradação pode ocorrer. Sua função na degradação *in vivo* do amido permanece obscura, porque as β -amilases têm sido encontradas nos vacúolos (ZIEGLER *et al.*, 1994). Estudos com

zimogramas, SDS-PAGE e *Western*, em tubérculos de batata, indicaram que a atividade de uma nova forma de amilase é aparentemente induzida pelo fenômeno de “cold-sweetening”, no período de degradação ativa do amido, e que esta nova forma parece ser de β -amilase (HILL *et al.*, 1996; NIELSEN *et al.*, 1997).

Por outro lado, em tubérculos de batata a degradação do amido também está associada com seu grau de fosforilação. Uma proteína designada como R₁ está envolvida na fosforilação do grão de amido (LORBERTH *et al.*, 1998; YU *et al.*, 2001). Em batata, o resultado da repressão pelo antisense de R₁, provocou redução no teor de fosfato ligado ao amido e também reduziu a degradação do amido nas plantas transgênicas, ocasionando excesso de amido nas folhas e a diminuição do “cold-sweetening” nos tubérculos (LORBERTH *et al.*, 1998).

A conversão de amido para sacarose e subsequente clivagem da sacarose, resultaram em acúmulo de hexoses (ISHERWOOD, 1973), indicando que a maior causa do acúmulo de hexoses em tubérculos armazenados sob baixas temperaturas é a diminuição na velocidade das reações glicolíticas, resultando, assim, em aumento na disponibilidade de hexoses fosfato. Por outro lado, foi demonstrado que o acúmulo de hexoses é dependente da variedade (SOWOKINOS, 1973; VLIET e SCHRIEMER, 1960).

A sacarose pode ser degradada pela ação de duas enzimas, a sacarose sintase e as invertases. A sacarose sintase está localizada no citossol e pode estar envolvida tanto na síntese quanto na degradação da sacarose, uma vez que catalisa uma reação reversível. Porém, a sacarose sintase tem sido encontrada em maiores concentrações nos tecidos onde ocorre mais degradação do que síntese de sacarose. Isso indica que esta enzima parece estar mais envolvida na degradação da sacarose, onde catalisa a degradação da sacarose através da reação da sacarose com uridina difosfato (UDP), produzindo frutose e UDP-glicose. A invertase pode estar presente na parede celular, no vacúolo e no citossol e, ao contrário da sacarose sintase, catalisa a hidrólise irreversível da sacarose em duas hexoses (glicose e frutose), que são posteriormente fosforiladas no processo glicolítico às custas de ATP (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Muitos estudos têm sido realizados para identificar qual das duas enzimas está envolvida no adoçamento dos tubérculos de batata, quando submetidos a baixas temperaturas. PRESSEY (1969) mediu os níveis de hexoses, a atividade da invertase ácida e do inibidor da invertase em tubérculos armazenados sob baixas temperaturas e concluiu que a regulação da hidrólise da sacarose era o resultado da interação entre a invertase e o seu inibidor. O pesquisador mostrou que a atividade da sacarose sintase diminuiu após a colheita do tubérculo e permaneceu baixa após o armazenamento tanto a 4°C como a 18°C. Da mesma forma, ZHOU (1994) verificou que em tubérculos de batata armazenados por 28 dias a 1°C, a atividade da sacarose sintase não foi alterada. Portanto, parece que não há conexão entre a sacarose sintase e o acúmulo de hexoses em tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas. Por outro lado, SASAKI *et al.*, (1971); MARANGONI *et al.*, (1997) e CHAPPER (2000), observaram aumento na atividade da invertase ácida solúvel em alguns variedades armazenados a baixas temperaturas. Ao expressarem um inibidor da invertase de fumo em um genótipo de batata, armazenado sob baixas temperaturas, GREINER *et al.* (1999) observaram grande redução da atividade da invertase e do acúmulo de hexoses. Forte correlação entre as concentrações de hexose e sacarose e a atividade da invertase ácida solúvel, foi verificada por ZRENNER *et al.* (1996), em 24 variedades de batata. Eles observaram que a redução da atividade da invertase ácida diminuiu os conteúdos de hexoses e aumentou os de sacarose, quando comparados ao controle. Como a quantidade total de açúcares solúveis não variou significativamente com o aumento nos níveis de atividade da invertase, os pesquisadores concluíram que as invertases não controlam os níveis de glicose, frutose e sacarose em tubérculos submetidos a baixas temperaturas. Porém, existem várias formas de invertase que podem ser induzidas pelo frio e apresentam diferenças em sua cinética de interação com a proteína inibidora (SASAKI *et al.*, 1971).

O processo de adoçamento de tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas parece também envolver a enzima uridina difosfato pirofosforilase (UGPase), que converte de forma reversível a UDP-glicose e o

pirofosfato (PPi) em UTP e glicose-1-fosfato. A disponibilidade de UDP-glicose limita a formação de sacarose nas células de batata, pois HILL *et al.* (1996) notaram em batatas, que quando a concentração da sacarose aumenta, ocorre redução paralela na concentração de UDP-glicose. Em estudo dos padrões alélicos da UGPase em 16 clones de batata, através de SDS-PAGE e Western, verificou-se que os clones sensíveis ao adoçamento demonstraram a predominância de um alelo específico da UGPase, o alelo *UgpA*, sugerindo a participação específica desta enzima no “cold-sweetening” (SOWOKINOS, 2001).

A sacarose fosfato sintase (SPS) é uma enzima que contribui para o ciclo de síntese e degradação da sacarose em tubérculos de batata (GEIGENBERGER e STITT, 1993; GEIGENBERGER *et al.*, 1997). Esta enzima é regulada por mecanismos que operam em níveis e épocas diferentes (HUBER e HUBER, 1996). A regulação alostérica, envolvendo ativação pela glicose-6-fosfato (G₆P) e a inibição por fosfato inorgânico (Pi), permite que a síntese da sacarose seja imediatamente aumentada em resposta à maior disponibilidade de seus precursores. A SPS também é regulada por fosforilação de proteína (HUBER e HUBER, 1996). A fosforilação e desfosforilação ocorrem entre 5-10 minutos, alterando as propriedades cinéticas da enzima. A fosforilação leva a uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato, e a torna mais susceptível à inibição por Pi e mais dependente de G₆P (SIEGL, G. *et al.*, 1990).

A SPS de tubérculos de batata é regulada alostéricamente e por fosforilação da proteína (GEINGENBERGER *et al.*, 1995). Outra estratégia potencialmente importante para regulação envolve a expressão de formas alternativas de isoenzimas dessa proteína que diferem nas suas propriedades cinéticas e regulatórias. O acúmulo de sacarose entre 2-4 dias de armazenamento sob baixa temperatura coincidiu com uma variação nas propriedades cinéticas da SPS (HILL *et al.*, 1996). A SPS de plantas de batata contém quatro polipeptídios que podem executar tarefas diferentes nas plantas (SPS-1a; SPS-1b; SPS-2 e SPS-3). REIMHOLZ *et al.* (1997), armazenaram tubérculos de batatas a 4°C e 20°C, por quatro semanas e observaram, através

de estudos com SDS-PAGE e *Western*, aumento na atividade da SPS-1b de tubérculos armazenados a 4°C, quando comparada a de 20°C, que expressa principalmente a SPS-1a. A SPS-1a é largamente distribuída, sendo a maior forma em todos os tecidos, exceto pétalas, sépalas e estames. A atividade da SPS-1b é extremamente baixa em tecidos jovens como folhas dreno, flores jovens fechadas e tubérculos dreno, é um pouco mais alta em folhas fonte, em tubérculos em brotação, brotos de tubérculo e estames, e é especialmente alta em pétalas e sépalas, onde o sinal é similar ou excede a expressão da SPS-1a e aumenta sua expressão nos tubérculos em resposta à baixa temperatura. A SPS-2 tem baixo limite de detecção em tecidos jovens em crescimento, está presente como uma forma menor em folhas fonte e tubérculos em brotação, e é a maior forma nos estames. A SPS-3 somente é detectada em tecidos em crescimento extremamente jovens como pequenas folhas dreno, jovens flores fechadas e brotos de tubérculos em crescimento.

O processo de adoçamento, além de ter a participação de várias enzimas, também parece ser de natureza poligênica, pois THILL e PELOGUIN (1994), concluíram que há pelo menos três loci-chave envolvidos nos processos de adoçamento e acondicionamento, isto é, remoção do açúcar acumulado, e que um ou mais genes podem ser comuns a ambos processos. Logo, as baixas temperaturas de armazenamento promovem a expressão de isoformas específicas de enzimas, entre elas as invertases, UGPase, SPS, e amilases. Informações sobre a identificação e caracterização das isoenzimas envolvidas no processo de adoçamento, provocado pelas baixas temperaturas, ainda são escassas na literatura.

Quando os tubérculos de batata são armazenados sob temperaturas inferiores a 10°C, a taxa respiratória diminui. Porém, foi verificado que em temperaturas inferiores a 5°C, a taxa respiratória é temporariamente estimulada (DWELLE *et al.*, 1978; MARANGONI *et al.*, 1997). O aparecimento deste surto respiratório é seguido de diminuição na taxa respiratória e sua estabilização (ISHERWOOD, 1973, 1976; AMIR *et al.*, 1977) está associada à respiração resistente ao cianeto, pois ao se estudar tubérculos de batata armazenados a 4°C, AMIR *et al.* (1977) verificaram que a redução na respiração, ocorrida após

o armazenamento, coincidiu com o nível máximo de ATP e que posteriormente houve um surto respiratório com rápido declínio no conteúdo de ATP. Desta forma, a via alternativa poderia utilizar o excesso de ATP e minimizar a produção de radicais livres quando a disponibilidade dos elétrons para o complexo desidrogenase excede a capacidade do citocromo oxidase (PURVIS e SHEWFELT, 1993). WISMER (1995) também verificou aumentos na formação de radicais livres ao comparar tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas, da variedade Norchip, sensível ao processo de “cold-sweetening”, com a variedade tolerante ND860-2. Quanto ao metabolismo da sacarose, SOLOMOS e LATIES (1975) sugeriram que este açúcar agiria como um dreno para o excesso de ATP através da via alternativa e AMIR *et al.* (1977) observaram que o pico respiratório corresponde com a máxima concentração de sacarose. Contudo, SHERMANN *et al.* (1982) acreditam que a ativação da respiração resistente ao cianeto e o aumento nos níveis de sacarose podem fazer parte de rotas independentes. Desta maneira, MARANGONI *et al.* (1997) propuseram que quando os tubérculos de batata são armazenados sob temperaturas inferiores a 5°C, inicialmente ocorre diminuição na respiração e aumento no nível de ATP ativando a oxidase alternativa o que é acompanhado por aumento nos níveis de sacarose e redução nos níveis de ATP. O aumento ocorrido nos níveis de sacarose ativaria as invertases, provocando aumentos nos teores de glicose e frutose, observados no processo de “cold-sweetening”. Além dos efeitos das baixas temperaturas sobre a redução da atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, a glicólise foi também reduzida e foi apontada como a causa provável do acúmulo de hexoses (VIOLA e DAVIES, 1994; DIXON e ap REES, 1980a, b).

As baixas temperaturas também podem provocar a deterioração das membranas do amiloplasto, como observado por OHAD *et al.* (1971), ao armazenar tubérculos de batata a 4°C. A perda da seletividade dessas membranas pode alterar a distribuição de metabólitos entre o citossol e os amiloplastos, colocando em contato enzimas e substrato, aumentando assim o adoçamento dos tubérculos de batata.

Até o momento não existe nenhuma evidência conclusiva que explique as prováveis causas do adoçamento induzido por baixas temperaturas. Por exemplo, o aumento nos níveis de hexoses-fosfato parece ocorrer antes do acúmulo de açúcares (ISHERWOOD, 1973; CLAASSEN *et al.*, 1993). As alterações nos níveis de hexoses-fosfato, em plantas transgênicas com reduzida expressão de pirofosfato, não responderam ao efeito de baixas temperaturas (JELITTO *et al.*, 1992; HAJIREZAEI *et al.*, 1994).

O entendimento detalhado sobre o metabolismo do nitrogênio em tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas, ainda não é bem esclarecido. O estudo do fluxo de nitrogênio, em tubérculos, é de grande importância comercial, em função do envolvimento dos aminoácidos na reação de Maillard, responsável pelo escurecimento durante a fritura, de tubérculos armazenados sob temperaturas inferiores a 8°C (BRIERLEY *et al.*, 1997). A glutamina sintetase (GS) é a enzima chave na assimilação de íons amônio em glutamina, a qual pode fornecer nitrogênio para outros compostos orgânicos (SECHLEY *et al.*, 1992). Em tubérculos de batata, o nitrogênio é incorporado em proteínas, em aminoácidos, ou permanece na forma de nitrogênio inorgânico (VAN ES e HARTMANS, 1981). O percentual de nitrogênio total por grama de peso fresco está normalmente entre 0,24 e 0,36% (BURTON, 1966), os quais podem variar de acordo com as práticas de fertilização (ROE *et al.* 1990; KLEIN *et al.*, 1980; HUGHES *et al.*, 1984). Do conteúdo de nitrogênio total, o nitrogênio protéico constitui cerca de 37,5 a 63,7% e o restante é constituído pela fração não protéica (BURTON, 1966). Por outro lado, os estudos de TALLEY *et al.* (1970) e EPPENDORFER *et al.* (1979), sugerem que aproximadamente 50% do conteúdo total de nitrogênio são de proteínas, 40% de amida e aminoácidos e os 10% restantes são de nitrogênio ligado à fração não protéica. Para o processamento de batata, cerca de 40 a 50% da fração de aminoácidos livres (SMITH 1968) tem sido associada ao problema de escurecimento durante a fritura (reação de Maillard) (HABIB *et al.*, 1957; FITZPATRICK *et al.*, 1966). A concentração de aminoácidos é significativamente alterada pela fertilização, ou seja, uma fertilização com altos teores de nitrogênio provoca aumentos nos teores de aminoácidos (ROE *et al.*

1990; HOFF *et al.* 1971) bem como no grau de escurecimento por unidade de açúcar redutor (ROE *et al.*, 1990; HUGHES *et al.*, 1984). As amidas asparagina e glutamina são parte de uma alta proporção do “pool” de aminoácidos livres (BRIERLEY *et al.*, 1996). A formação de glutamato pode ser resultante da ação da glutamina sintetase ou da quebra de proteínas de armazenamento, como a patatina e o complexo protéico 22-kDa, que contêm resíduos de asparagina e glutamina (SUH *et al.*, 1990), o que leva à necessidade de estudo dessa enzima e do metabolismo do nitrogênio em si.

Um dos procedimentos que vêm sendo testados em batata, a fim de reduzir os altos teores de açúcares provocados pelas baixas temperaturas, é o acondicionamento. Este processo é caracterizado pelo armazenamento de tubérculos, que haviam sido previamente expostos a baixas temperaturas, em temperaturas mais altas, por exemplo, de 8 para 20°C. BURTON (1982), verificou que no acondicionamento, cerca de 80% dos teores de açúcares redutores foi convertido em amido e o restante foi perdido na respiração. Porém, nem sempre o resultado deste processo é positivo, porque depende do tempo que os tubérculos estiveram expostos ao frio e de cada variedade (BURTON, 1982). A conversão de açúcares a amido sob altas temperaturas pode, por um lado, suprimir as enzimas envolvidas no acúmulo de açúcar e, por outro lado, induzir aquelas que convertem a sacarose em amido (ILLEPERUMA *et al.*, 1998). Concordando com esses resultados, DEITING *et al.* (1998) armazenaram tubérculos de batata por 14 dias a 3°C e depois transferiram esses tubérculos para 20°C, os pesquisadores observaram redução de aproximadamente 50% no teor de hexoses.

O “cold-sweetening” vem sendo estudado há mais de um século, porém as pesquisas realizadas com as variedades brasileiras são muito recentes. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito das baixas temperaturas de armazenamento sobre o metabolismo de carboidratos em três variedades de batata, com respostas contrastantes ao adoçamento; identificar a ocorrência de isoformas envolvidas neste processo, e verificar o efeito do acondicionamento sobre os teores de açúcares solúveis totais resultantes do armazenamento sob baixa temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Neste trabalho foram utilizados tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) das variedades Pérola, Atlantic e Eliza, provenientes da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. A variedade nacional Eliza, segundo PEREIRA e CAMPOS (1999), apresenta maiores níveis de açúcares quando seus tubérculos são submetidos a baixas temperaturas, sendo processada na forma de purê e saladas. A variedade Atlantic, de origem norte-americana, apresenta níveis intermediários de açúcares e é indicada a nível mundial para fritura na forma de fatias, podendo ser utilizada também para a produção de batata palha (MELO, 1999). A variedade Pérola é utilizada na forma de “batata palha”, apresentando, entre as variedades brasileiras, os menores níveis de açúcares (PEREIRA e CAMPOS, 1999), quando armazenada sob baixas temperaturas.

EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Após brotação, os tubérculos foram plantados em janeiro de 2003, na horta nova da Universidade Federal de Viçosa, localizada a 20°45'LS, 42°51'LO, a 652m de altitude. Os solos foram adubados com 1500 kg/ha de adubo, fórmula 04-14-8; 15 kg/ha de bórax; 15 kg/ha de sulfato de zinco; 100 kg/ha de sulfato de magnésio. As plantas foram pulverizadas com Curzate e Ridomil. Aos 30 dias após a emergência, foi feita uma adubação em cobertura com 60 kg/ha de sulfato de amônio e foi realizada a amontoa. Foi utilizado espaçamento de 0,8 m x 0,3 m. Após a colheita, realizada em abril, os tubérculos foram transportados para o laboratório de Nutrição e Metabolismo Vegetal da UFV (DBV), e divididos em dois lotes homogêneos, no delineamento experimental inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 x 6 x 2, sendo três variedades, seis períodos de amostragem e duas temperaturas de armazenamento (15°C e 2°C). Amostras dos dois tratamentos foram

retiradas aos 0, 3, 7, 10, 20 e 30 dias de armazenamento, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80°C. Todas as amostras consistiram de 5 repetições. O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados.

RECONDICIONAMENTO

Aos 10 dias de armazenamento sob temperatura de 2°C, tubérculos das três variedades foram recondicionados a 15°C. Aos 10 e 20 dias de recondicionamento foram tomadas 5 repetições de cada amostra.

EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E DE AMIDO

A extração de açúcares solúveis totais seguiu metodologia descrita por TRETHERWEY *et al.* (1998). Com o auxílio de um furador de rolhas, com 8 mm de diâmetro e perfazendo todo diâmetro do tubérculo, foram retirados cilindros de regiões aleatórias dos tubérculos das três variedades, em todos os tratamentos. Estes cilindros foram seccionados em discos de 1-2 mm de espessura, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Aproximadamente 300 mg dos discos foram macerados em gral e pistilo com 1 mL de etanol 80%, até a obtenção de um extrato homogêneo. O extrato foi incubado por 90 minutos a 70°C em um bloco térmico. Em seguida os extratos foram centrifugados a 13.000 *g* por um período de 10 minutos. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 80%, repetindo-se a centrifugação. O sobrenadante foi novamente decantado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de 80% etanol. Foi realizada nova centrifugação a 13.000 *g*, por 10 minutos. Os três sobrenadantes foram misturados e utilizados para determinação de sacarose e glicose. O sedimento, resultante da extração etanólica, foi ressuspensionado em 1mL de KOH 0,2 N, agitado vigorosamente em um agitador do tipo vórtex. As amostras foram então incubadas a 95°C por 1 hora em banho-maria. Após esse período, adicionaram-se 70 µL de ácido acético 1N, para neutralizar o meio. Logo em

seguida, foi realizada nova centrifugação como descrita acima. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer à temperatura de -20°C até o momento da análise do amido.

DETERMINAÇÃO DE AMIDO

A determinação dos teores de amido seguiu metodologia descrita por TRETHERWEY *et al.* (1998) a qual consistiu de duas reações, sendo a primeira realizada em tubos eppendorf e a segunda em um leitor de placa de E.L.I.S.A., Versamax, da Molecular Devices Inc, Sunnyvale, Califórnia. Na primeira reação 20 µL de extrato foram adicionados a um meio de reação contendo tampão citrato 300 mM pH 4,6 e amiloglicosidase 2U/5 µL, num volume final de 300 µL. As amostras foram incubadas por 45 minutos a 60°C. Desse meio de reação foram retirados 20 µL e adicionados a um segundo meio contendo tampão imidazol 100 mM pH 6,9; MgCl₂ 5 mM; NAD 2 mM; ATP 1 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 2U/mL, proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, perfazendo um volume total de 285 µL por poço em uma placa de E.L.I.S.A. A reação foi iniciada com a adição de hexocinase 1,4U/5 µL e o teor de amido foi medido espectrofotometricamente a 340 nm.

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

A determinação de açúcares solúveis totais seguiu metodologia descrita por TRETHERWEY *et al.* (1998), a qual foi realizada em um leitor de placa de E.L.I.S.A., onde foram adicionados 10 µL de extrato a um meio de reação contendo tampão imidazol 100 mM pH 6,9; MgCl₂ 5 mM; NAD 2 mM; ATP 1 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 2U/mL, proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, perfazendo um volume final de 284 µL por poço. Os teores de glicose foram determinados pela adição de hexocinase 1,4U/5 µL. Após o término da reação de determinação de glicose, foi adicionada invertase 2U/µL, para determinação da sacarose. Os teores de glicose e sacarose foram

medidos em um espectrofotômetro através de mudanças na absorvância, seguidas continuamente a 340 nm.

DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

Os teores de proteínas solúveis totais foram determinados segundo metodologia desenvolvida por Bradford (1976). Foram utilizados 5 µL de extrato etanólico que foram adicionados ao meio de reação contendo 1 mL de reagente Bradford, previamente filtrado, e 195 µL de água, totalizando um volume de 1,2 mL. Como padrão foi utilizado BSA 0,1% (p/v). O teor de proteínas solúveis totais foi determinado espectrofotometricamente a 595 nm.

AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

O teor de aminoácidos solúveis totais foi determinado segundo MOORE e STEIN (1948). Vinte microlitros de extrato etanólico foram adicionados ao meio de reação contendo 1,5 mL de reagente ninhidrina e 1,98 mL de água. As amostras foram fervidas por 20 minutos, e após esfriarem foi adicionados 8 mL de etanol 50%, perfazendo um volume final de 11,5 mL. Após 10 minutos de repouso, fez-se a leitura das amostras em espectrofotômetro a 570 nm. Como padrão utilizou-se uma mistura de glicina 0,25 mM; ácido glutâmico 0,25 mM; fenilalanina 0,25 mM e arginina 0,25 mM. Para o preparo do reagente ninhidrina, foram usados 32 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 20 mL de tampão citrato 0,2 M, pH 5,0 e 0,8 g de ninhidrina dissolvidas em 20 mL de etileno glicol monometil éter. Após a mistura completou-se o volume para 100 mL.

ATIVIDADE RESPIRATÓRIA

Para a determinação das taxas respiratórias foram coletadas alíquotas de 1,0 mL da atmosfera interna de três frascos de vidro (1,6 L), contendo tubérculos inteiros (600 – 800 g), hermeticamente fechados, armazenados a 15°C e 2°C. A homogeneização da atmosfera interna dos frascos foi obtida com

o auxílio de um mini-ventilador (“cooler de computador”) e alíquotas foram tomadas com auxílio de seringas plásticas descartáveis de 1,0 mL de volume. A concentração de CO₂ da atmosfera interna dos frascos, foi determinada em cromatógrafo a gás (Mod. GC 14B, Shimatsu), equipado com detector de condutividade térmica e coluna empacotada com Porapak-Q (80-100 mesh, 1m de comprimento e 3,2 mm de diâmetro interno). Utilizou-se como gás de arraste o nitrogênio (N₂ - 80kPa), com fluxo de 40 – 45 mL min⁻¹. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram respectivamente, 60; 100 e 140°C. A corrente utilizada foi de 85 mA (miliampere), com o valor 1 de atenuação. A quantificação das concentrações de CO₂, dentro dos frascos, foi feita pela comparação do pico produzido pela amostra com aquele produzido pela aplicação de uma alíquota de 1,0 mL de um padrão de 488 ppm de CO₂, sendo a taxa respiratória estimada, na matéria fresca, em mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹, utilizando-se as equações propostas por KAYS (1991).

EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

EXTRAÇÃO

A extração enzimática foi baseada na metodologia de GEIGENBERGER e STITT (1993). Com o auxílio de um furador de rolhas, com 8 mm de diâmetro e perfazendo todo diâmetro do tubérculo, foram retirados cilindros de regiões aleatórias dos tubérculos das três variedades, de todos tratamentos. Estes cilindros foram seccionados em discos de 1-2 mm de espessura. Aproximadamente 500 mg dos discos foram macerados, sobre um bloco de gelo, em gral contendo nitrogênio líquido. Após a maceração foram adicionados 1 mL de tampão de extração contendo tampão HEPES-KOH 50 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 5 mM; benzamidina 2 mM; ácido α-amino-n-capróico 2 mM; PMSF 0,5 mM; glicerol 10% (v/v) e triton X-100 0,1% (v/v). Após a centrifugação a 13.000 g por 10 minutos, 500 µL de extrato foram dessalinizados em colunas Sephadex G-25. Após a dessalinização os

extratos foram armazenados no freezer. Todo processo de extração foi conduzido em câmara fria, sob uma temperatura média de 10°C.

EXTRAÇÃO DA GLUTAMINA SINTETASE

A extração da glutamina sintetase (GS) foi baseada na metodologia descrita por RATAJCZACK e MAZUROWA (1981), com pequenas modificações. Com o auxílio de um furador de rolhas, com 8 mm de diâmetro e perfazendo todo diâmetro do tubérculo, foram retirados cilindros de regiões aleatórias dos tubérculos das três variedades, de todos tratamentos. Estes cilindros foram seccionados em discos de 1-2 mm de espessura. Aproximadamente 200 mg dos discos foram macerados, sobre gelo, em tampão de extração contendo tampão Tris 100 mM, pH 8,0; MgSO₄ 50 mM; β-mercaptoetanol 5 mM; EDTA 1 mM, perfazendo um volume final de 800 µL. Após a homogeneização, cada amostra foi centrifugada a 15.000 g por 15 minutos, o sobrenadante recolhido e utilizado para determinação da atividade da glutamina sintetase. O processo de extração foi conduzido em câmara fria, sob uma temperatura média de 10°C.

DETERMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

INVERTASE ÁCIDA SOLÚVEL (EC 3.2.1.26)

A atividade da atividade da invertase ácida solúvel foi baseada na metodologia descrita por ZRENNER *et al.* (1995), com algumas modificações. Antes de determinar a atividade da invertase ácida solúvel, as amostras foram agitadas por 15 minutos a 4°C, a fim de eliminar a interferência da proteína inibidora de acordo com a metodologia de PRESSEY (1966). A atividade da invertase ácida foi determinada através de duas reações, sendo a primeira realizada em tubos eppendorf e a segunda reação acoplada foi realizada em um leitor de placa de E.L.I.S.A. Para isso, 10 µL de extrato foram adicionados em um meio contendo tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,2 e 80 µL de sacarose 20 mM. Esse meio de reação foi incubado por uma hora a 37°C em

banho-maria. Após esse período, o meio foi neutralizado com fosfato de sódio 1 M, pH 7,0 seguindo-se de fervura por 4 minutos. Os brancos foram fervidos por 5 minutos antes da incubação. Foram retiradas alíquotas de 5 µL do meio da primeira reação e adicionadas ao segundo meio de reação que continha tampão imidazol 100 mM, pH 6,9; MgCl₂ 5 mM; NAD 2 mM; ATP 1 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 2U/mL provenientes de *Leuconostoc mesenteroides*, totalizando um volume de 265 µL por poço. A reação foi iniciada pela adição de hexocinase 1,4U/5 µL e medida através de mudanças na absorvância, seguidas continuamente a 340 nm.

SACAROSE SINTASE (EC 2.4.1.13)

A determinação da atividade da sacarose sintase foi baseada na metodologia descrita por GEIGENBERGER e STITT (1993). Para isso, 5 µL de extrato foram adicionados num meio de reação contendo tampão HEPES-KOH 20 mM, pH 7,0; sacarose 100 mM e UDP 4 mM, totalizando um volume de 50 µL. Este meio foi incubado por 30 minutos a 25°C. A reação foi paralisada através da fervura por 4 minutos, com exceção dos brancos que foram fervidos por 5 minutos antes da incubação. Alíquotas de 80 µL foram retiradas e adicionadas ao segundo meio que continha MgCl₂ 5 mM; NAD 2 mM; glicina 0,2 M, pH 8,9 perfazendo um volume final de 300 µL por poço. A reação foi iniciada pela adição de UDP-glicose desidrogenase 0,005U/µL e sua atividade foi medida a 340 nm.

SACAROSE FOSFATO SINTASE (EC 2.4.1.14)

A determinação da atividade da sacarose fosfato sintase foi baseada na metodologia de HUBER *et al.* (1989). Foram determinadas as atividades seletivas (V_{sel}) e não seletivas ($V_{máx}$). Para a atividade máxima da SPS ($V_{máx}$), ou ensaio não seletivo, foram usados 15 µL de extrato e colocados num meio contendo tampão HEPES 50 mM, pH 7,4; DTT 1 mM; MgCl₂ 12 mM; frutose-6-fosfato (F₆P) 12 mM; glicose-6-fosfato (G₆P) 36 mM e UDP-glicose (UDPG) 6 mM, totalizando um volume de 1400 µL. As amostras foram incubadas por 30

minutos a 25°C. Após esse período adicionou-se KOH (30%) e a reação foi paralisada por 10 minutos de fervura. O ensaio seletivo (V_{sel}) continha tampão HEPES 50 mM, pH 7,4; DTT 1 mM; $MgCl_2$ 12 mM; frutose-6-fosfato (F_6P) 2 mM; glicose-6-fosfato (G_6P) 6 mM e fosfato inorgânico (Pi) 5 mM. O produto da reação, sacarose-6-fosfato, foi quantificado pela reação com o reagente antrona e através da determinação da absorvância em espectrofotômetro a 620 nm. A sacarose foi utilizada como padrão.

FOSFORILASE DO AMIDO (EC 2.4.1.1)

A determinação da atividade da fosforilase do amido foi baseada na metodologia descrita por SWEETLOVE *et al.* (1996). Para tanto 10 μ L de extrato foram adicionados num meio de reação contendo tampão HEPES-NaOH 50 mm, pH 7,4; $MgCl_2$ 5 mM; NAD 0,25 mM; glicose-1,6-bisfosfato 0,024 mM; fosfoglicomutase 2U/mL; Na_2HPO_4 4,5 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 1,4U/mL, proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, perfazendo um volume de 300 μ L por poço. A reação foi iniciada pela adição de amilopectina 0,0025% (p/v) e medida pela alteração na absorvância a 340 nm. Os brancos foram realizados com o mesmo volume de extrato fervidos por 5 minutos antes da incubação.

ATIVIDADE AMIDOLÍTICA TOTAL (a e b-amilase)

A determinação da atividade amidolítica total foi baseada na metodologia descrita por ROBINSON *et al.* (1988). Para tanto 6 μ L de extrato foram diluídos para 200 μ L de tampão de extração. Dessa solução, 80 μ L foram adicionados a um meio de reação contendo solução de amido 500 μ g/mL; $CaCl_2$, 400 μ g/mL, perfazendo um volume total de 850 μ L. As misturas foram incubadas por 20 minutos a 37°C em banho-maria. Após esse período foram adicionados 100 μ L de lugol e 500 μ L de água e lidas em espectrofotômetro a 620 nm. Os brancos foram realizados com a adição de lugol antes do amido. Como padrão foi utilizada uma solução de amido de até 500 μ g.

ALDOLASE (EC 4.1.2.13)

A determinação da atividade da aldolase foi baseada na metodologia descrita por GERHARDT *et al.* (1987). Para tal 15 µL de extrato foram adicionados a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; MgCl₂ 5 mM; EDTA 1 mM; NADH 150 µM; triose fosfato isomerase 5U/mL; glicerol-3-fosfato desidrogenase 2U/mL, perfazendo um volume final de 285 µL por poço. A reação foi iniciada pela adição de frutose-1,6-bisfosfato 2 mM e medida através de mudanças na absorvância a 340 nm. Como branco utilizaram-se extratos fervidos por 5 minutos antes de sua incubação.

URIDINA DIFOSFATO GLICOSE PIROFOSFORILASE (EC 2.7.7.9)

A determinação da atividade da uridina difosfato glicose pirofosforilase (UGPase) foi baseada na metodologia de ZRENNER *et al.* (1993). Para tanto 3 µL de extrato foram diluídos para 27 µL de tampão de extração. Dessa solução, 5 µL foram adicionados a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; MgCl₂ 2 mM; UDP-glicose 2 mM; NAD 0,25 mM; glicose-1,6-bisfosfato 20 µM; fosfoglicomutase 3U/mL; NaF 2 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 2,5U/mL, proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, perfazendo um volume final de 300 µL por poço. A reação foi iniciada pela adição de Na-PPi 2 mM e medida a 340 nm. Os brancos foram fervidos por 5 minutos antes da incubação.

GLUTAMINA SINTETASE (EC 6.3.1.2)

A determinação da glutamina sintetase (GS) foi baseada na metodologia descrita por RATAJCZACK e MAZUROWA (1981), com pequenas modificações, 200 µL de extrato foram adicionados a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; ATP 6,25 mM; MgSO₄ 45 mM; NH₂OHCl 6,25 mM (Hidroxilamina) e L-glutamato 93,75 mM, totalizando um volume de 375 µL. O meio foi incubado por 30 minutos a 30°C em banho-maria e a reação paralisada pela adição de solução férrica contendo FeCl₃ 0,37 mM; HCl 0,67 mM e ácido tricloroacético 0,2 mM (TCA). As amostras foram

centrifugadas a 9000 x g por 5 minutos e lidas na absorvância de 540 nm. Os brancos foram realizados pela adição de solução férrica antes da incubação. A curva padrão foi realizada com Fe-L-glutamyl- γ -hidroxamato (GHA).

GÉIS DE ATIVIDADE

INVERTASE ÁCIDA SOLÚVEL

A atividade da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata foi detectada usando gel de atividade baseada na metodologia de GABRIEL e WANG (1969). Foram utilizados 100 μ g de proteína em eletroforese num gel de poliacrilamida não desnaturante (8%) utilizando corrente constante de 100V por uma hora e 30 minutos, em geladeira. O gel foi lavado 3-4 vezes com triton X-100 (1% v/v) e colocado por 1 hora e 30 minutos a 37°C, em banho-maria, num meio contendo sacarose 100 mM e acetato de sódio 100 mM, pH 4,6. Em seguida o gel foi lavado 3-4 vezes com água e corado com uma solução de NaOH 500 mM contendo 0.1% (p/v) de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). A reação de cor foi realizada em forno de microondas, potência máxima (cerca de 900 W) por aproximadamente 2 a 5 minutos, seguido de fixação com ácido acético (10%). Todo procedimento de coloração do gel foi realizado no escuro.

FOSFORILASE DO AMIDO

A atividade da fosforilase do amido em tubérculos de batata foi detectada usando gel de atividade baseada na metodologia de RAMMESMAYER *et al.* (1992). Foram utilizados 100 μ g de proteína em eletroforese num gel de poliacrilamida não desnaturante (7,5%) contendo 1% (p/v) de amido solúvel utilizando corrente constante de 100V, por uma hora e 30 minutos, em geladeira. Após a corrida o gel foi lavado duas vezes por 20 minutos com água destilada e incubado por 3 horas a 37°C, em banho-maria, num meio contendo tampão Tris-citrato 50 mM, pH 6,2; 1,4-ditio-DL-treitol 2,5 mM (DTT); glicose-1-fosfato 10 mM (G₁P) e EDTA 5 mM. O gel foi lavado por

20 minutos com água destilada e corado com lugol para detectar o consumo de amido.

ATIVIDADE AMIDOLÍTICA TOTAL

A atividade amidolítica total em tubérculos de batata foi detectada usando gel de atividade baseada na metodologia de DEITING *et al.* (1998), com pequenas modificações. Foram utilizados 100 µg de proteína em eletroforese num gel de poliacrilamida não desnaturante (7,5%) contendo 0,1% (p/v) de amido solúvel utilizando corrente constante de 100V por uma hora e 30 minutos, em geladeira. Após a corrida o gel foi lavado duas vezes por 10 minutos com água destilada e incubado overnight a 37°C, num meio contendo tampão MES-KOH 50 mM, pH 6,2; CaCl₂ 2 mM e β-mercaptoetanol 0,1% (v/v). O gel foi lavado por 10 minutos com água destilada e corado com lugol para detectar o consumo de amido.

PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

As proteínas solúveis totais em tubérculos de batata foram detectadas com base na metodologia de LAEMMLI (1970). Foram utilizados 40 µg de proteína num gel de poliacrilamida (7,5%) utilizando corrente constante de 100V por uma hora e 30 minutos, em geladeira. Após a corrida o gel foi corado com comassie blue R-250.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes de comparação entre as médias foram realizados com o teste t, utilizando os algoritmos embutidos no programa Excell (Microsoft, Seattle, USA)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O metabolismo do amido em tubérculos de batata variou conforme a variedade e a temperatura (Figura 1A). O armazenamento da batata por 30 dias, a 15°C, causou acentuada degradação do amido na variedade Eliza, seguida da Atlantic, e não teve efeito sobre a variedade Pérola. Aos 10 dias de armazenamento a variedade Eliza apresentou aumento no teor de amido.

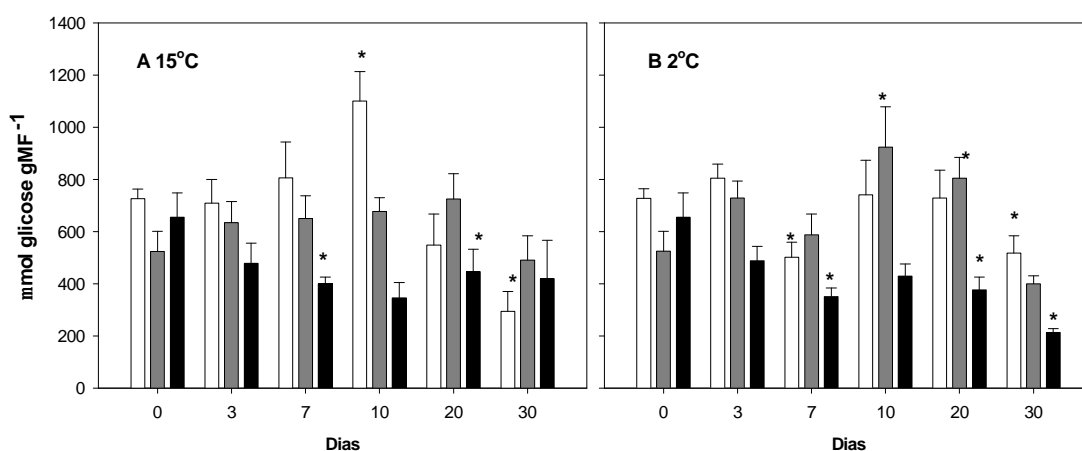


Figura 1. Teor de amido (μmol glicose-equivalente g MF^{-1}) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

Sob 2°C, a variedade Atlantic apresentou o menor teor de amido, ao longo do período de armazenamento, seguida de Eliza, quando se compara aos níveis do dia zero (Figura 1B). Os teores de amido da variedade Pérola não apresentaram reduções significativas durante os 30 dias de armazenamento. As quedas nos teores de amido podem ser devidas ao aumento na atividade das amilases e fosforilase do amido, conforme verificado por ZRENNER *et al.* (1995) que encontraram aumento no teor de hexoses quando os tubérculos são armazenados sob baixas temperaturas. Resultados semelhantes foram também encontrados por LARCHER (1995) e ISHERWOOD (1973), os quais observaram que nos tubérculos armazenados

sob baixas temperaturas, o amido é convertido em açúcares. O armazenamento à temperatura de 2°C por um período de 10 e 20 dias, ocasionou aumento temporário nos teores de amido na variedade Pérola (Figura 1B). Esse incremento pode ser devido às coletas de discos em diferentes tubérculos e em diferentes regiões do mesmo tubérculo, pois CHAPPER *et al.* (2002) verificaram que os teores de amido variam entre as variedades, dentro da planta mãe, entre as épocas de colheita e entre regiões central e periférica do tubérculo. Os resultados aqui obtidos provavelmente devem ser devido à síntese do amido, pois VIOLA *et al.* (1994), observaram que em tubérculos armazenados a 3°C e 15°C, incorporaram [U- ¹⁴C] glicose no amido. Isto demonstra que os tubérculos de batata maduros retêm a capacidade de síntese de amido, embora a duração desse processo seja desconhecida. Sabe-se, ainda, que diferentes grãos de amido podem ser degradados por maneiras diferentes. Os do tipo cristalino A, podem ser facilmente degradados porque possuem canais que podem torná-los mais acessíveis às enzimas degradativas, do que os do tipo cristalino B. É possível que a variedade Pérola possua grãos de amido mais resistentes à degradação do que as variedades Atlantic e Eliza, pois COFFIN *et al.* (1987) também encontraram variedades que não diminuem seus teores de amido com o armazenamento a baixas temperaturas. Esse resultado pode ser devido às menores atividades das enzimas degradativas do amido, conforme verificado em tubérculos de batata por COCHRANE *et al.* (1991) e COTTRELL *et al.* (1993).

O amido pode ser degradado por diferentes enzimas, tais como as amilases e fosforilase do amido. A atividade da fosforilase do amido, a 15°C apresentou variação significativa. Nesta temperatura, as variedades Eliza e Atlantic apresentaram tendência de aumento, enquanto que em Pérola houve tendência de queda (Figura 2A). Entretanto, quando os tubérculos foram armazenados a 2°C a atividade da fosforilase do amido permaneceu constante nas variedades Eliza e Atlantic, ao passo que na variedade Pérola houve queda (Figura 2B).

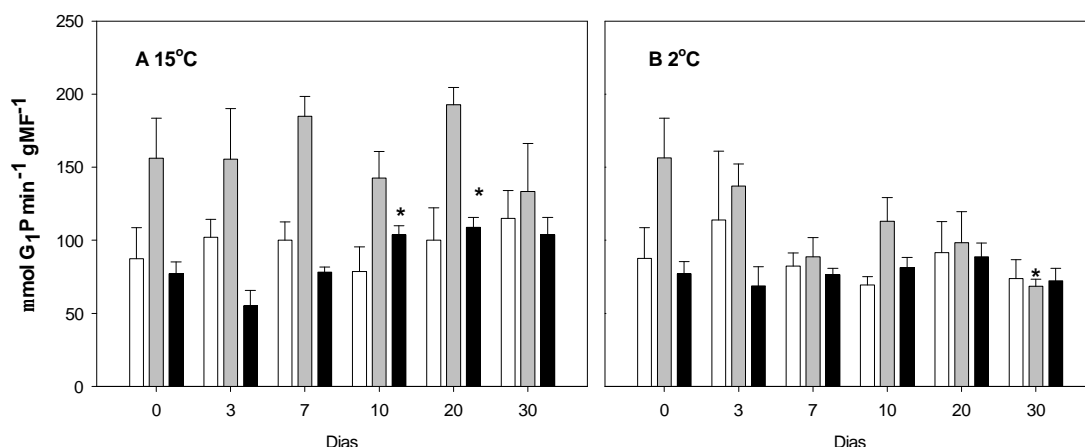


Figura 2. Atividade da fosforilase do amido ($\mu\text{mol G}_1\text{P min}^{-1}\text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectado pelo teste t ($P < 0,05$).

Como se pode observar, a atividade da fosforilase do amido é variável e altamente dependente de variedade. Enquanto ILLEPERUMA *et al.* (1998), verificaram que a degradação do amido foi realizada via fosforilase do amido, outros autores, tais como KENNEDY e ISHERWOOD (1975) e POLLOCK e AP REES (1975) não encontraram variação na atividade dessa enzima em tubérculos mantidos sob baixas temperaturas. Portanto, parece que outras enzimas ou suas isoformas estão envolvidas na degradação do amido, quando os tubérculos são armazenados sob baixas temperaturas, conforme observado por ISHERWOOD (1976). No presente trabalho, através do gel de atividade da fosforilase do amido, não foi possível identificar um padrão distinto de expressão de isoformas em resposta à baixa temperatura (Figuras 6 e 7), enquanto que uma alteração no padrão de expressão de isoformas de amilases foi observada (Figuras 4 e 5). Em algumas variedades de batata podem existir duas isoformas da fosforilase do amido, sendo uma plastídica e a outra citoplasmática, de acordo com KOSSMANN e LLOYD (2000). A inibição da sua expressão, usando tecnologia de antisenso, alterou a estrutura do amido, e nestes tubérculos a amilopectina apresentou maior proporção de cadeias mais curtas do que nos controles não transformados (DUWENIG *et al.*, 1997). A

fosforilase do amido também pode estar envolvida no alongamento de glicanas, conforme verificado por SMITH e DENYER, (1992); ZEEMAN *et al.*, (1998 a). Assim, o papel da fosforilase do amido ainda permanece obscuro e estudos mais aprofundados se fazem necessários.

Como se verifica na Figura 3A, a atividade amidolítica total (α e β -amilase) aumentou na variedade Eliza, quando armazenada a 15°C, a qual coincidiu com degradação de amido (Figura 1A). A atividade de amilases na variedade Pérola foi maior no terceiro dia de armazenamento. A atividade amidolítica da variedade Atlantic foi maior nos dias 7 e 10 de armazenamento, período em que se observou redução nos teores de amido, estabilizando-se com o decorrer do tempo. A 2°C as atividades de amilases aumentaram nas três variedades, em função do período de armazenamento (Figura 3B), com alterações mais pronunciadas em Eliza. O aumento na atividade amidolítica total (α e β -amilases) coincidiu com a degradação de amido tanto em Pérola, quanto em Atlantic (Figura 1B), o que não foi verificado para a fosforilase do amido que manteve atividade constante (Figura 2B). Para avaliar a contribuição das diferentes isoenzimas das enzimas envolvidas na degradação do amido, em tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas, foram realizados géis de atividade das enzimas fosforilase do amido e amilases. Foram observadas diferenças na atividade das isoformas das amilases em relação às variedades, períodos e temperatura de armazenamento. A variedade Atlantic apresentou maior nível de glicose e degradação do amido em ambas temperaturas, possuindo maior nível de atividade para uma das isoformas de amilases (Figuras 4 e 5). Em ambas variedades foi detectado o aparecimento de uma nova isoforma aos 10 dias de armazenamento sob 2°C (Figura 5). Entretanto, o aparecimento dessa nova isoforma não pôde ser associada com alterações nos níveis de degradação de amido.

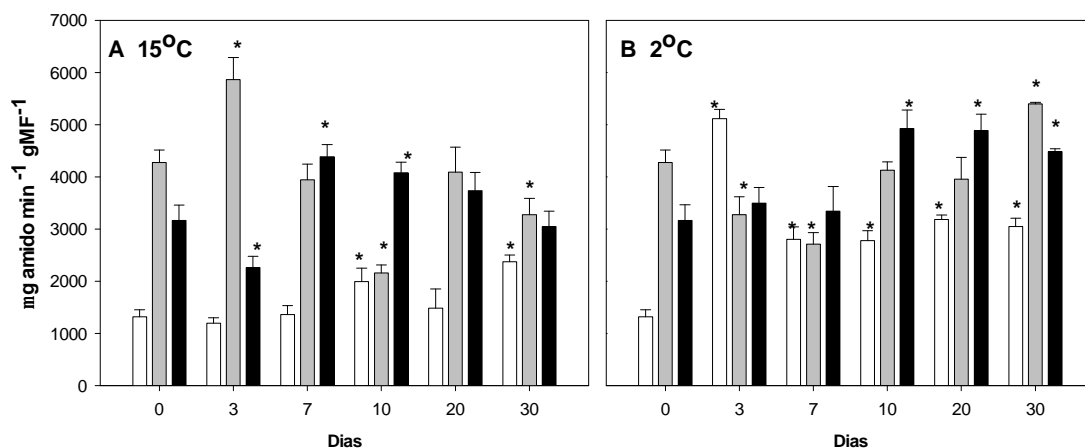


Figura 3. Atividade amidolítica total ($\mu\text{mol amido min}^{-1}\text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste *t* ($P < 0,05$).



Figura 4. Gel de atividade de amilases (α e β -amilases) em tubérculos de batata da variedade Pérola armazenados aos 3 e 7 dias sob 15°C (poços 3 e 7, respectivamente) e sob 2°C (poços 4 e 8, respectivamente) em relação ao controle (poço 1) e da variedade Atlantic aos 3 e 7 dias sob 15°C (poços 5 e 9, respectivamente) e sob 2°C (poços 6 e 10, respectivamente) em relação ao controle (poço 2).

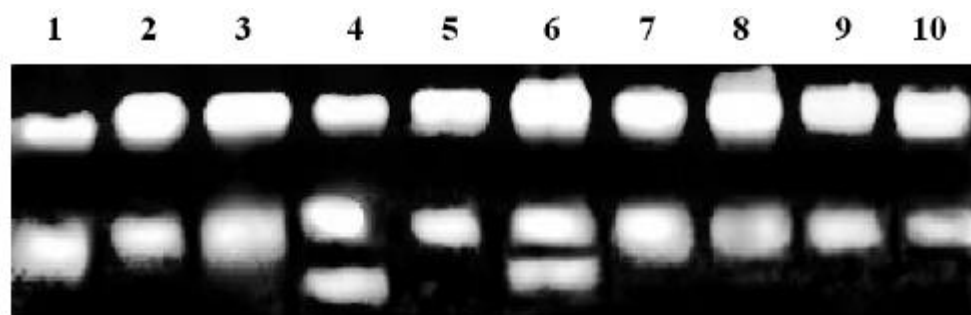


Figura 5. Gel de atividade de amilases (α e β -amilases) em tubérculos de batata da variedade Pérola armazenados aos 10 e 30 dias sob 15°C (poços 3 e 7, respectivamente) e sob 2°C (poços 4 e 8, respectivamente) em relação ao controle (poço 1) e da variedade Atlantic aos 10 e 30 dias sob 15°C (poços 5 e 9, respectivamente) e sob 2°C (poços 6 e 10, respectivamente) em relação ao controle (poço 2).

Porém, em relação à atividade da fosforilase do amido, somente uma isoforma foi observada e não houve diferença no nível da atividade entre as variedades estudadas (Figuras 6 e 7). Os resultados desse trabalho estão de acordo com aqueles previamente obtidos por NIELSEN (1997), e sugerem que a via amidolítica parece ser a principal rota de degradação do amido quando os tubérculos dessas variedades são armazenados sob baixas temperaturas.

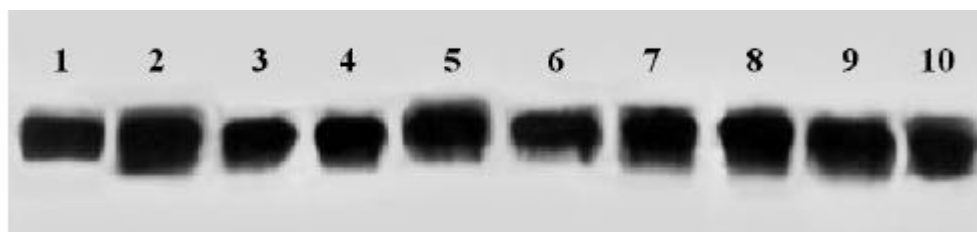


Figura 6. Gel de atividade de fosforilase do amido em tubérculos de batata da variedade Pérola armazenados aos 3 e 7 dias sob 15°C (poços 3 e 7, respectivamente) e sob 2°C (poços 4 e 8, respectivamente) em relação ao controle (poço 1) e da variedade Atlantic aos 3 e 7 dias sob 15°C (poços 5 e 9, respectivamente) e sob 2°C (poços 6 e 10, respectivamente) em relação ao controle (poço 2).

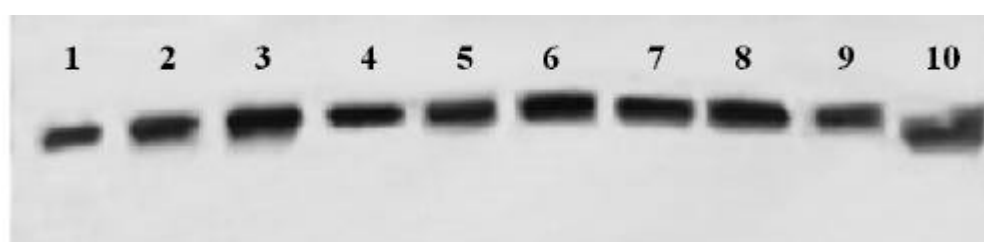


Figura 7. Gel de atividade de fosforilase do amido em tubérculos de batata da variedade Pérola, armazenados aos 10 e 30 dias sob 15°C (poços 3 e 7, respectivamente) e sob 2°C (poços 4 e 8, respectivamente) em relação ao controle (poço 1) e da variedade Atlantic aos 10 e 30 dias sob 15°C (poços 5 e 9, respectivamente) e sob 2°C (poços 6 e 10, respectivamente) em relação ao controle (poço 2).

Dessa forma, como a atividade de amilases aumentou a 2°C (Figura 3B) e coincidiu com a degradação do amido (aos 30 dias; Figura 1B), com incrementos nas atividades amidolíticas associados com maiores níveis de açúcares (Figura 15B), e o gel de atividade de amilases apresentou um padrão diferenciado de isoforma, estes resultados em conjunto, indicam que a principal rota de degradação do amido é via amidolítica. Resultados semelhantes foram obtidos por DEITING *et al.* (1998), pois quando submeteram tubérculos a 3°C,

a atividade de amilases aumentou de 7 a 8 vezes, quando comparada ao controle. Em tubérculos de batata, as amilases podem apresentar várias isoformas, conforme observado por NIELSEN *et al.* (1997). Porém quando os tubérculos são armazenados sob baixas temperaturas, apenas uma isoforma, provavelmente de uma β -amilase, aumenta sua atividade, indicando que ela pode estar envolvida no “cold-sweetening”, conforme observado por DEITING *et al.* (1998), HILL *et al.* (1996) e NIELSEN *et al.* (1997). Enquanto COCHRANE *et al.* (1991) e COTTRELL *et al.* (1993) encontraram aumento na atividade de amilases sob baixa temperatura, SOWOKINOS *et al.* (1985) não encontraram variação. Estes resultados contraditórios talvez ocorram em função da presença de múltiplas isoformas de amilases com atividades se sobrepondo. Além disso, isoformas purificadas de uma mesma planta podem ter propriedades diferentes. Por exemplo, MACGREGOR (1983), verificou em cevada duas isoformas com diferentes capacidades de degradar os grãos de amido intactos. WALKER e HOPE (1963), verificaram que grãos de amido intactos, isolados em tubérculos de batata, não foram digeridos quando α -amilases de várias fontes vegetais foram utilizadas. Isso pode indicar que os grãos de amido da batata podem ser estruturalmente diferentes de outras espécies vegetais ou que em batata as α -amilases talvez tenham um pequeno papel na degradação do amido. Esses resultados são contraditórios porque WITT e SAUTER (1996), mostraram que a α -amilase de tubérculos de batata tem capacidade de se ligar ao grânulo de amido intacto, bem como degradá-lo *in vitro*. Quanto às β -amilases, suas funções na degradação do amido *in vivo* permanecem obscuras, uma vez que, de acordo com ZIEGLER *et al.* (1994), sua localização é preferencialmente vacuolar. Embora não se saiba como as β -amilases degradam os grãos de amido intactos, devido à sua localização celular, HILL *et al.* (1996) e NIELSEN *et al.* (1997) verificaram o aparecimento de uma β -amilase induzida pelo “cold-sweetening”, durante o período de degradação do amido. No presente trabalho, não foram determinadas as atividades específicas de α e β -amilases, portanto, não podemos concluir quais delas estão envolvidas no processo de degradação do amido nas variedades testadas.

Nos tubérculos armazenados a 15°C , foi observado um aumento temporário nos teores de sacarose em todos as variedades. Entretanto, o aumento foi bem maior quando o armazenamento foi realizado a 2°C (Figura 8), o qual associou-se com o maior incremento nos níveis de glicose observado nesta mesma temperatura (Figura 15). Esse aumento pode estar associado ao aumento nos níveis do ativador alostérico glicose-6-fosfato, o qual poderia ser também consequência do aumento nos níveis de hexoses. Pérola apresentou aumento significativo nos teores de sacarose ao longo do tratamento a 2°C, enquanto que a 15°C ocorreu aumento a partir dos três dias que se estabilizou ao final do tratamento (Figura 8A).

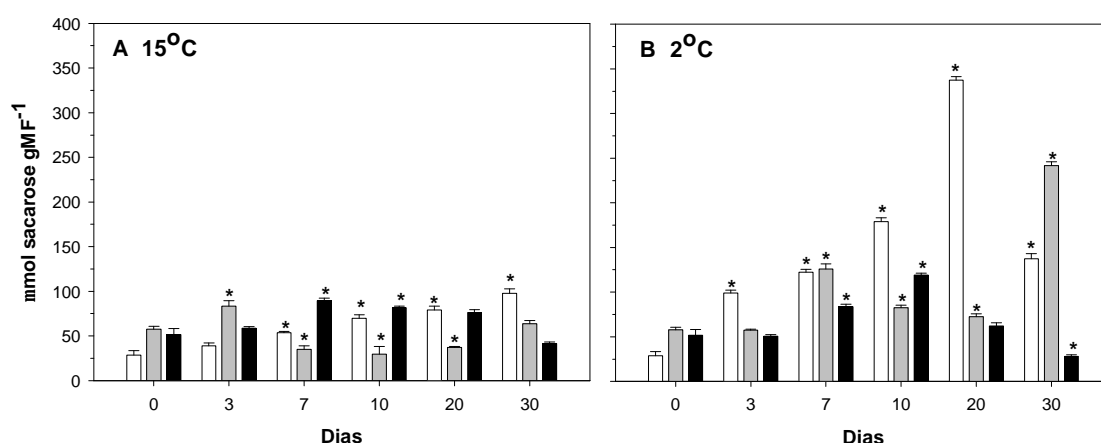


Figura 8. Teor de sacarose (μmol sacarose gMF^{-1}) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

A variedade Atlantic, armazenada a 15°C, apresentou aumento nos teores de sacarose, em geral, do sétimo ao décimo dia, o qual estabilizou ao final do período de armazenamento. Quando a variedade Atlantic foi armazenada a 2°C os teores de sacarose aumentaram no mesmo período, porém diminuíram ao final do tratamento. Dentre as três variedades estudadas, Eliza apresentou maiores teores de sacarose sob as duas temperaturas de armazenamento, enquanto que Pérola também apresentou aumentos significativos no armazenamento a 2°C.

O aumento dos teores de sacarose em Eliza associou-se, nas duas temperaturas de armazenamento, com a degradação do amido (Figura 1). Em Pérola não houve ligação entre a degradação do amido e o aumento nos teores de sacarose. Atlantic apresentou associação entre os níveis de sacarose e a degradação do amido nos dias 7 e 10 de armazenamento a 15°C e a 2°C. O aumento nos teores de sacarose, nas duas temperaturas do tratamento, da variedade Eliza também se associou com o aumento na atividade máxima da sacarose fosfato sintase (SPS) (Figura 9), ao passo que na variedade Pérola esta associação ocorreu somente quando do armazenamento a 2°C (Figura 10B). Curiosamente, o aumento na atividade máxima da SPS em Eliza ocorreu em paralelo à redução na atividade seletiva e na ativação da SPS. Em Pérola, a atividade máxima da SPS apresentou maiores incrementos, em ambas temperaturas, quando comparadas à Eliza. Esses aumentos associaram-se com menores reduções na atividade seletiva e ativação da SPS (Figura 10).

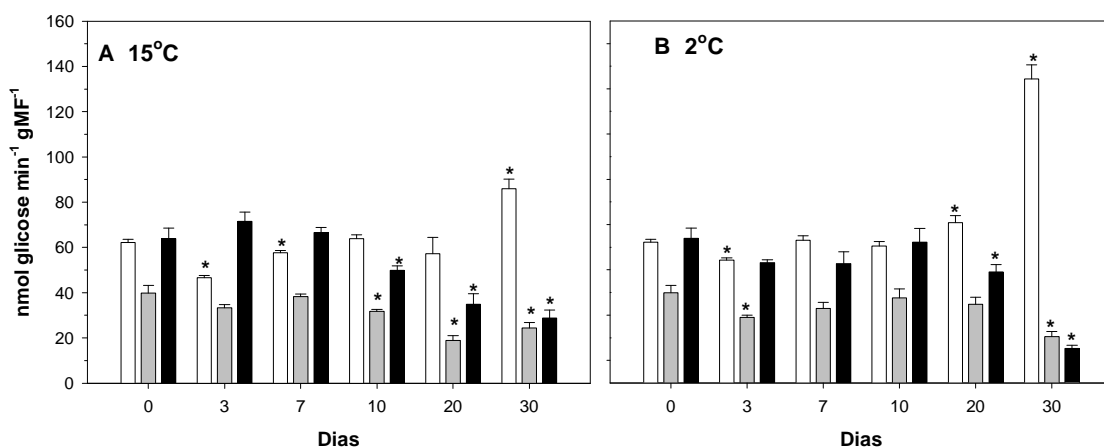


Figura 9. Atividade de sacarose fosfato sintase (nmol glicose min⁻¹gMF⁻¹; □ V_{máx}, ■ V_{sel} e ■ Ativação *in vivo*), em tubérculos de batata da variedade Eliza, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste *t* (P<0,05).

A 15°C os altos teores de sacarose verificados na variedade Atlantic foram coincidentes com aumento encontrado na atividade máxima da SPS (Figura 11A), enquanto que a 2°C (Figura 11B) ocorreram maiores aumentos na atividade máxima da SPS, como também observado para as outras variedades. Ao contrario de Eliza, sob 2°C, não foi detectada redução na

atividade seletiva da SPS e as reduções na ativação dessa enzima foram mais discretas. O aumento na atividade máxima da SPS a 2°C também se associou com o aumento nos teores de sacarose nessa temperatura (Figura 8B).

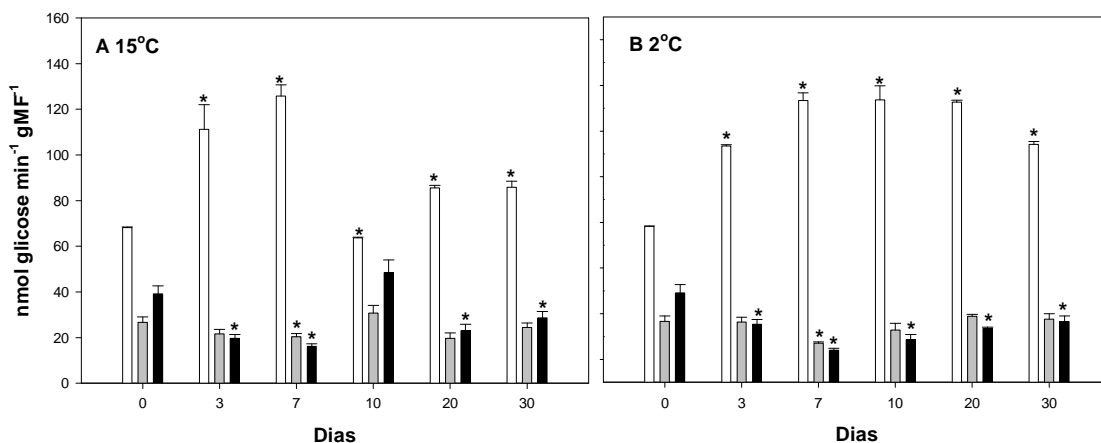


Figura 10. Atividade de sacarose fosfato sintase ($\text{nmol glicose min}^{-1}\text{gMF}^{-1}$; \square $V_{\text{máx}}$, \square V_{sel} e \blacksquare Ativação *in vivo*) em tubérculos de batata da variedade Pérola, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste *t* ($P < 0,05$).

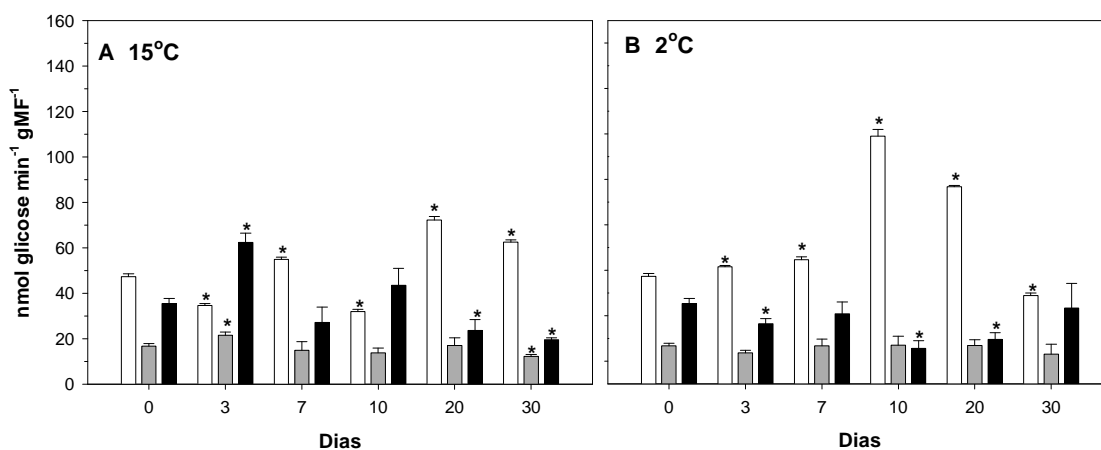


Figura 11. Atividade de sacarose fosfato sintase ($\text{nmol glicose min}^{-1}\text{gMF}^{-1}$; \square $V_{\text{máx}}$, \square V_{sel} e \blacksquare Ativação *in vivo*) em tubérculos de batata da variedade Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste *t* ($P < 0,05$).

Pequenas reduções na atividade seletiva foram observadas para todas variedades em períodos específicos do armazenamento, em ambas temperaturas testadas. Estas reduções estiveram, em geral, associadas com reduções significativas na ativação da enzima. Entretanto, mais freqüente foi o descompasso entre os maiores incrementos do $V_{m\acute{a}x}$ em relação aos menores incrementos no V_{sel} na redução do nível total de ativação da enzima. Houve consistência entre alterações nos teores de sacarose e a atividade da SPS em todas variedades e temperaturas, indicando o papel preponderante da SPS sobre a sacarose sintase, na síntese de sacarose em tubérculos armazenados. A discrepância entre os aumentos na $V_{m\acute{a}x}$, paralelos às reduções na V_{sel} , sugerem que ocorre aumento na expressão gênica da SPS, em resposta a baixas temperaturas. Embora não possa ser descartada a expressão de isoformas com características cinéticas diferentes. A atividade da SPS variou entre as variedades. Pérola, menos susceptível ao adoçamento, apresentou os menores níveis de glicose, os maiores de sacarose, bem como as mais altas atividades da SPS. Estes resultados sugerem que a SPS pode contribuir para a diminuição dos níveis de hexoses. Nos tubérculos de batata, a sacarose fosfato sintase tem um papel chave na síntese da sacarose, conforme verificado por STITT (1997), contribuindo também para o ciclo de síntese e degradação da sacarose (ciclo fútil da sacarose). Resultados de experimentos com frutose marcada forneceram evidências que o aumento na ressíntese da sacarose foi mediado por esta enzima nos trabalhos de GEIGENBERGER e STITT (1993) e GEIGENBERGER *et al.* (1997). A síntese da sacarose também tem sido associada ao estresse, incluindo déficit hídrico (ZRENNER e STITT, 1991) e baixa temperatura (LARCHER, 1995), e talvez desempenhe uma função na osmoregulação e crioproteção em muitos tecidos vegetais. Assim como no nosso experimento, com exceção do comportamento observado pela variedade Atlantic, ILLEPERUMA *et al.* (1998) observaram aumentos de 2,2 vezes na atividade da SPS em tubérculos de batata armazenados por 28 dias a 1°C, indicando que a SPS pode ter uma função importante na síntese de sacarose de tubérculos armazenados sob baixas temperaturas. A reação catalisada pela SPS não é irreversível, mas a remoção do seu produto pela sacarose fosfato

fosfatase compromete a reação na via de síntese da sacarose, conforme verificados nos estudos de KRAUSE e STITT (1991). As pesquisas de HUBER e HUBER (1996), indicaram que a SPS é regulada por vários mecanismos que operam em níveis e épocas diferentes. Em tubérculos de batata, esta enzima é regulada alostéricamente e por fosforilação da proteína (GEINGENBERGER *et al.*, 1995). Outra estratégia importante para regulação, envolve a expressão de formas alternativas de uma proteína, diferindo nas suas propriedades cinéticas e regulatórias. Por exemplo, HILL *et al.*(1996) verificaram que o acúmulo de sacarose, provocado pela baixa temperatura, coincidiu com uma alteração nas propriedades cinéticas da SPS. A SPS de plantas de batata contém quatro polipeptídios, chamados SPS-1a; SPS-1b; SPS-2 e SPS-3. Quando REIMHOLZ *et al.* (1997), armazenaram tubérculos de batata a 4°C e 20°C por quatro semanas, observaram aumentos na atividade da SPS-1b nos tubérculos armazenados a 4°C, quando comparada a de 20°C, condição em que predomina a expressão da isoforma SPS-1a. O aumento na forma SPS-1b foi acompanhado da diminuição da forma SPS-1a. A SPS-2 não aumentou em resposta à baixa temperatura, mas aumentou durante o tempo de armazenamento prolongado sob baixa temperatura.

Em função do envolvimento da SPS no adoçamento dos tubérculos induzido por baixas temperaturas, são necessárias análises dos tubérculos das variedades Eliza, Pérola e Atlantic, que permitam identificar as isoformas da SPS envolvidas neste processo. O armazenamento dos tubérculos dessas variedades provocou aumento na atividade máxima da SPS (Figuras 9, 10 e 11). Esse aumento pode ser atribuído à síntese de novo dessa enzima, visto que o aumento da $V_{m\acute{a}x}$ não foi acompanhado por um aumento na ativação dessa enzima. Por outro lado, a atividade da sacarose fosfato sintase na presença do inibidor manteve-se inalterada ou foi reduzida (Figuras 9, 10 e 11). Esses resultados indicam que essas variedades talvez apresentem diferentes isoformas no processo de adoçamento daquelas caracterizadas por REIMHOLZ (1997).

A atividade da enzima uridina difosfato glicose pirofosforilase (UGPase) manteve-se constante em Eliza e Atlantic nas duas temperaturas de armazenamento (Figura 12).

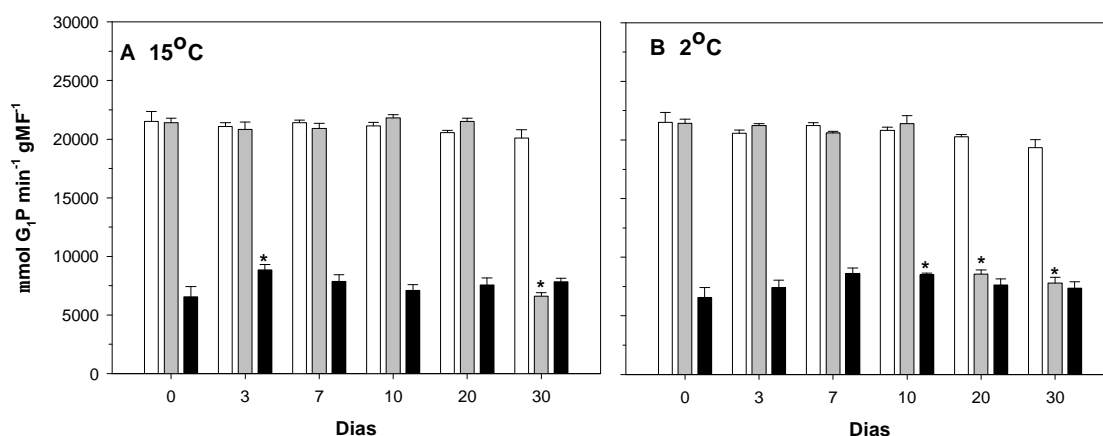


Figura 12. Atividade de UGPase ($\mu\text{mol glicose-1-fosfato min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

Em concordância com o nosso trabalho, a atividade da UGPase nos estudos de SOWOKINOS (1990) não foi significativamente afetada ao longo de todo tratamento pela temperatura e portanto, parece meramente participar na síntese da sacarose, fornecendo o substrato necessário. Porém, em Pérola ocorreu redução da atividade a partir dos 20 dias, a 2°C (Figura 12B) e aos 30 dias, a 15°C (Figura 12A). Posteriormente, SOWOKINOS (2001) analisou 16 clones de batata em relação aos padrões alélicos de UGPase e verificou que os 8 clones sensíveis ao adoçamento apresentaram a predominância do alelo *UgpA*. É possível que as variedades estudadas no nosso experimento, não expressem o alelo descrito por SOWOKINOS (2001), ou ao contrário, que esta expressão seja alta e constante desde o início do tratamento em ambas temperaturas e variedades de forma que não tenha sido possível diferenciar as alterações na sua atividade. Portanto, análises dos padrões alélicos da UGPase, através de *western blot* e por géis de atividade, são necessárias a fim de esclarecer o processo de adoçamento em Eliza, Pérola e Atlantic, porque

assim como o autor acima citado, THILL e PELOGUIN (1994) sugeriram que há pelo menos três loci-chave envolvidos nos processos de adoçamento e recondicionamento, isto é, remoção do açúcar, e que um ou mais genes pode ser comum a ambos os processos, indicando que o processo de adoçamento é de natureza poligênica.

Quanto às enzimas degradativas da sacarose, foi observado que a atividade da sacarose sintase (SS) diminuiu em Eliza e Atlantic e não se alterou em Pérola, quando os tubérculos foram armazenados a 15°C (Figura 13A). No entanto, quando do armazenamento a 2°C, a atividade da SS aumentou levemente nas três variedades (Figura 13B). Nos dois tratamentos foi encontrada maior atividade da sacarose sintase nos tubérculos da variedade Eliza, enquanto que em Pérola foram encontradas as menores atividades.

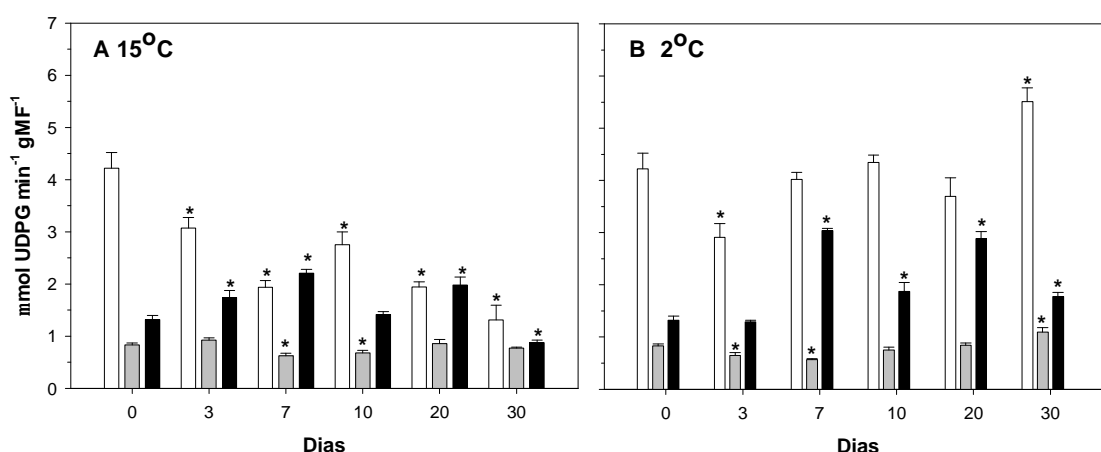


Figura 13. Atividade de sacarose sintase ($\mu\text{mol UDPG min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares □ Eliza, ■ Pérola e ■ Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

Enquanto a atividade da sacarose sintase permaneceu praticamente inalterada nos tubérculos de Pérola armazenados a 15°C (Figura 13A), a atividade da invertase ácida solúvel aumentou a partir dos 7 dias de tratamento. Esse incremento também foi observado em Atlantic e Eliza, declinando posteriormente (Figura 14A). A atividade da invertase aumentou imediatamente após a exposição a 2°C, ou seja, a partir dos 3 dias de

armazenamento, nas três variedades estudadas (Figura 14B), o que não foi observado para sacarose sintase (Figura 13B), em concordância com os resultados verificados por SASAKI *et al.* (1971).

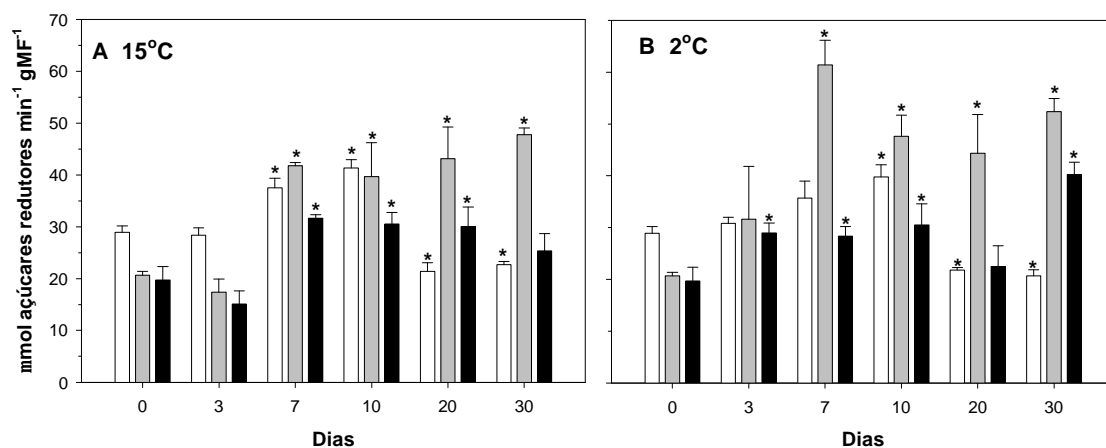


Figura 14. Atividade de invertase ácida solúvel (μmol açúcares redutores min^{-1} gMF^{-1}) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

Em ambas temperaturas de armazenamento as variedades Pérola e Atlantic apresentaram altas atividades das invertases até o final dos tratamentos, sendo que a 2°C a atividade foi maior. Na variedade Eliza, verificou-se uma queda na atividade de forma significativa a partir dos 20 dias, nos dois tratamentos.

Em virtude da baixa atividade da sacarose sintase e dos pequenos aumentos em sua atividade sob baixa temperatura (Figura 13B), e do aumento provocado pelas baixas temperaturas na atividade da invertase ácida solúvel, sugere que, nessas variedades, a invertase ácida solúvel é a principal enzima responsável pela degradação da sacarose,. Esta observação também foi feita por UPPAL *et al.* (1990), que armazenaram 8 variedades de batata a 3°C , por 90 dias, e verificaram que a atividade da invertase ácida aumentou durante o armazenamento, principalmente entre 0 e 30 dias. Da mesma forma, PRESSEY (1970) observou que a atividade da sacarose sintase diminuiu acentuadamente após a colheita do tubérculo e permaneceu baixa após o

armazenamento a 4°C e 18°C. Ao que tudo indica, não há estreita conexão entre a atividade sacarose sintase e o acúmulo de hexoses em tubérculos de batata armazenados sob baixas temperaturas.

Quando foram submetidos à temperatura de 15°C (Figura 15A), os teores de glicose nos tubérculos de Eliza e Pérola não variaram, apesar do aumento ocorrido na atividade da invertase ácida solúvel (Figura 14A). Porém, em Atlantic os teores de glicose aumentaram no final do tratamento, coincidindo com o aumento ocorrido na atividade da invertase (Figura 14A) e com a redução da taxa respiratória observada nessa variedade (Figura 17A). Tendências semelhantes também foram verificadas previamente por SOWOKINOS (1973), que relacionou os teores de hexoses resultantes às variedades.

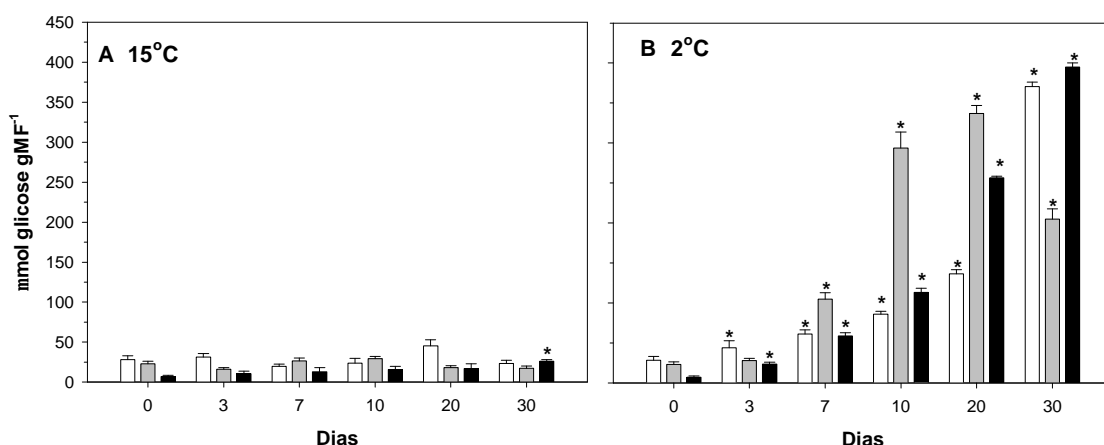


Figura 15. Teor de glicose ($\mu\text{mol glicose gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

Os resultados aqui encontrados estão em conformidade com os de RICHARDSON *et al.* (1990), os quais também verificaram que a atividade da invertase ácida e o conteúdo de hexose nem sempre foram concomitantes. Por outro lado, ZRENNER *et al.* (1996) encontraram, em tubérculos de batata de 24 variedades, forte correlação entre os teores de hexose / sacarose e a atividade da invertase ácida solúvel; também verificaram que a redução da atividade da invertase ácida diminuiu os conteúdos de hexose e aumentou os de sacarose.

Quando os tubérculos foram submetidos a 2°C, os teores de glicose aumentaram a partir dos sete dias de tratamento nas três variedades analisadas (Figura 15B), enquanto que sob 15°C não foi verificada alteração significativa nestes teores (Figura 15A). O maior incremento ocorreu em Atlantic, seguido de Eliza e Pérola. Porém, desde o início do período de armazenamento a variedade Eliza apresentou os maiores teores de glicose. Talvez pelo fato de apresentar altos teores de glicose, é que essa variedade seja mais indicada para ser processada na forma de purê, sendo portanto inadequada à fritura. Em função do acúmulo de glicose verificado na Figura 15B, verifica-se que a variedade Atlantic é mais sensível ao adoçamento do que Pérola, conforme descrito por Pereira & Campos (1999). O armazenamento a 2°C causou um aumento nos teores de glicose 8 vezes maior nessa variedade em relação a variedade Pérola, quando comparados com os valores apresentados no dia zero. Na variedade Eliza a elevação no teor de glicose foi associada com o pequeno aumento na atividade da sacarose sintase (Figura 13B), enquanto que em Pérola a elevação no teor de glicose associou-se com o aumento da atividade da invertase (Figura 14B). Em Atlantic, os altos teores de glicose se associaram com a redução na atividade da SPS (Figura 11B), com o aumento da atividade da invertase (Figura 14B) e com a redução nos teores de sacarose aos 30 dias de armazenamento (Figura 8B). Aos 30 dias de tratamento foi realizada uma fritura em nível doméstico, a fim de visualizar-se o resultado do processo de adoçamento. Os resultados obtidos após a fritura foram coerentes com as análises bioquímicas realizadas nesse período (Figura 16), indicando ser a glicose a hexose responsável pela reação de escurecimento (caramelização).

Ao longo dos tratamentos observamos flutuações nos teores de açúcares solúveis (Figuras 8 e 15), como também encontradas por BLENKINSOP *et al.* (2002), que estudaram por 4 anos tubérculos de batata de variedades sensíveis e de variedades resistentes ao adoçamento armazenados a 4°C, por 10 semanas. Esses pesquisadores verificaram que as variedades resistentes ao adoçamento apresentaram menores teores de açúcares totais do que as variedades sensíveis, em 3 dos 4 anos de estudo. Porém, em um

ano foram encontrados teores de açúcares muito semelhantes em ambas variedades.

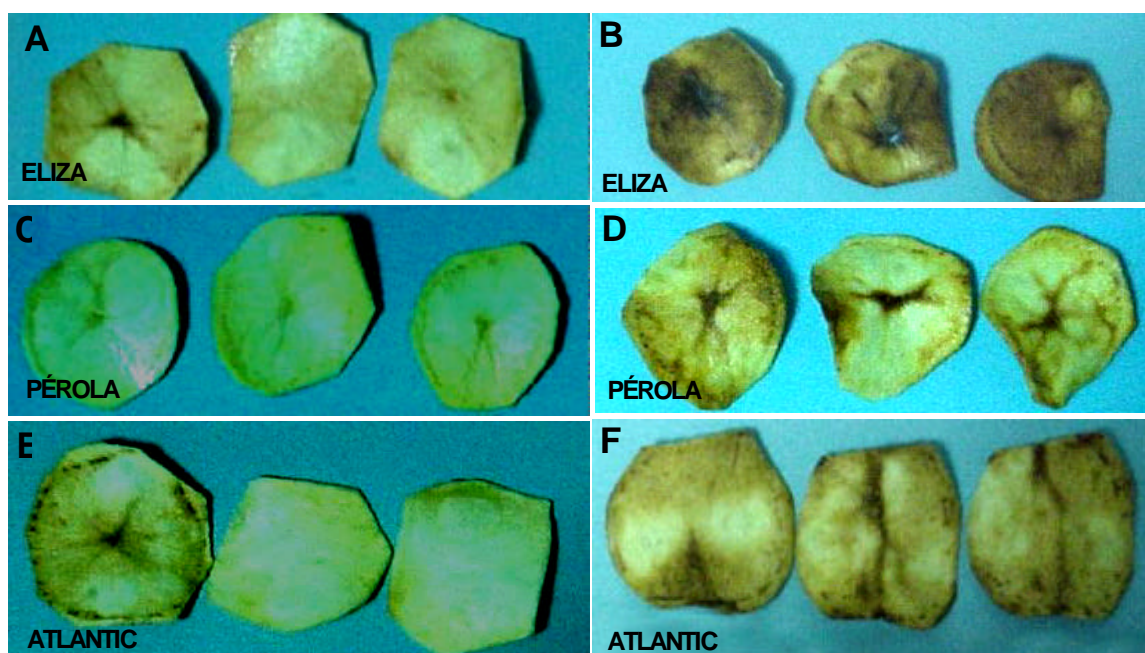


Figura 16. Fritura doméstica de fatias de tubérculos das cultivares Eliza, Pérola e Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A, C e E) e 2°C (B, D e F).

Os resultados apresentados na figura 16, sugerem que ocorrem diferenças nos teores de açúcares totais entre as regiões dos tubérculos de batata (central e periférica) e entre as épocas de plantio, conforme verificado por CHAPPER *et al.* (2002). Uma apreciável variação no conteúdo de hexose, não somente entre variedades, mas também entre tubérculos da mesma variedade crescidos sob as mesmas condições também foi observada por MORRELL *et al.* (1986); MILLER (1975); BURTON (1970) e NELSON (1976). Estes resultados parecem indicar que o conteúdo de hexoses nos tubérculos maduros não é determinado somente pelo metabolismo do tubérculo colhido, mas também pelo metabolismo que ocorre durante o seu desenvolvimento e pela partição e descarregamento inicial da sacarose no tubérculo de batata, determinando o conteúdo final de hexoses, conforme sugerido por MORRELL e AP REES (1986). Portanto, evidências indicam ser o metabolismo em tubérculos de batata, altamente dependente do material genético (variedade) e do ambiente de cultivo.

Quanto à atividade respiratória, todas as variedades apresentaram redução significativa imediatamente após a exposição a 2°C, ou seja, aos 3 dias de armazenamento (Figura 17B). Quando foram submetidas à temperatura de 15°C, as três variedades também apresentaram redução na atividade respiratória a partir dos 3 dias de tratamento (Figura 17A), porém esta redução foi bem menos acentuada do que a 2°C. No entanto, ao final dos 30 dias de tratamento verificou-se que ocorreu uma menor atividade respiratória sob a temperatura de 15°C.

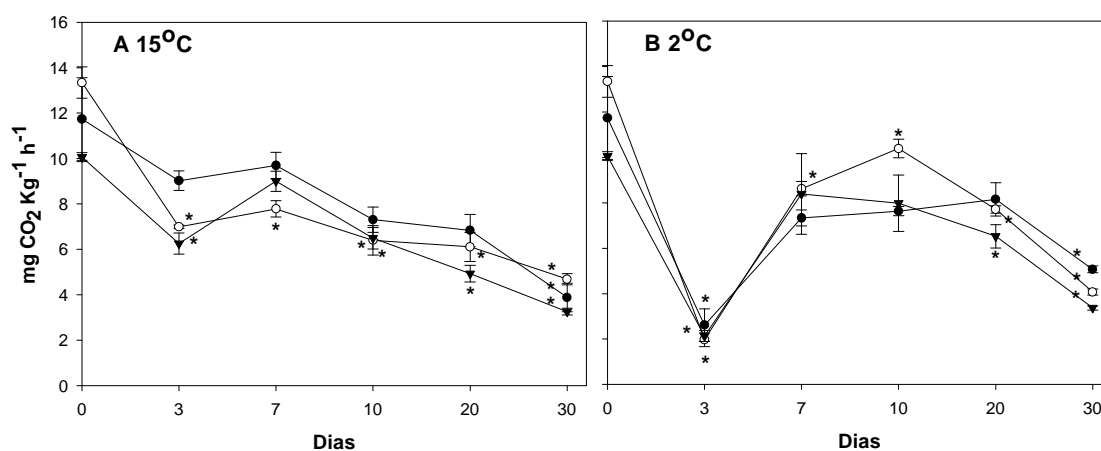


Figura 17. Atividade respiratória (mg CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) em tubérculos de batata das cultivares ● Eliza, ○ Pérola e ▼ Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste *t* (P<0,05).

O acúmulo de açúcares redutores, resultantes do armazenamento de tubérculos de batata a 2°C, foi atribuído por MARANGONI *et al.* (1997) a diferenças relativas entre a atividade da invertase e as capacidades glicolítica e respiratória. Os autores verificaram alta atividade de invertase acoplada à diminuição na capacidade glicolítica e respiratória, resultando num aumento dos açúcares redutores. No entanto, neste experimento parece que a redução na atividade respiratória não foi a causa importante no adoçamento, porque apesar do incremento na atividade da invertase ácida e na atividade de amilases, os teores de glicose verificados sob a temperatura de 15°C (Figura 15A) não se associaram com a menor taxa respiratória observada (Figura 17A). Da mesma forma, sob 2°C foram observados incrementos nos teores de

glicose ao longo do armazenamento (Figura 15B). Contudo, a atividade respiratória foi muito baixa apenas no 3º e 30º dia do armazenamento (Figura 17B).

Como pode ser verificada nas Figuras 18 A e B, a atividade da aldolase diminuiu em Eliza em ambas temperaturas, porém aumentou em Pérola e Atlantic diminuindo ao final do tratamento tanto a 15°C como 2°C. A aldolase é uma enzima que catalisa a reação reversível onde a frutose-1,6-bisfosfato (F1,6BP) é clivada em trioses fosfato, ou seja, gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato. O equilíbrio é determinado pela concentração de todos três compostos participantes dessa reação (BUCHANAN, 2000). É possível que essa enzima, como outras já mencionadas, seja controlada por fatores específicos da variedade, uma vez que não houve tendência uniforme para as três variedades. Em Pérola e Atlantic sob 2°C, é possível que a diminuição da taxa respiratória tenha provocado um acúmulo de trioses fosfato, deslocando a reação no sentido da F1,6BP, havendo aumento na atividade da aldolase, acarretando na ressíntese de amido e sacarose observadas (Figuras 1 e 8, respectivamente). Ao contrário, em Eliza a redução observada na atividade da aldolase pode ser associada aos menores teores de amido. A literatura não apresenta qualquer tipo de referência do envolvimento dessa enzima com o processo de adoçamento, impossibilitando a análise comparativa dos dados aqui apresentados.

Os teores de proteínas solúveis aumentaram em Eliza aos 20 e 30 dias, tanto a 15°C (Figura 19A) quanto a 2°C (Figura 19B). Em Pérola houve redução ao final do tratamento em ambas temperaturas, ao passo que em Atlantic os teores permaneceram praticamente inalterados nas duas condições de armazenamento. Portanto, parece que as baixas temperaturas não causaram grandes alterações nos teores de proteínas de cada variedade. Esses resultados estão de acordo com os de CHAPPER *et al.* (2000), que também não encontraram diferenças substanciais nos teores de proteínas quando armazenaram tubérculos de batata, por 40 dias, a 2°C e 21°C. No entanto, quando BRIERLEY *et al.* (1997) armazenaram tubérculos de batata, por 35 semanas, observaram que a atividade de proteinase foi maior nos tubérculos

armazenados a 10°C do que naqueles armazenados a 5°C. Desta maneira, os pesquisadores concluíram que o aumento da temperatura incrementa a mobilização de nitrogênio. Contrariamente, NOWAK *et al.* (1975) sugeriram que a baixa temperatura aumenta a degradação de proteínas. Os resultados obtidos neste experimento e nos trabalhos acima citados, sugerem estreita relação do metabolismo protéico com a variedade e com o período de armazenamento.

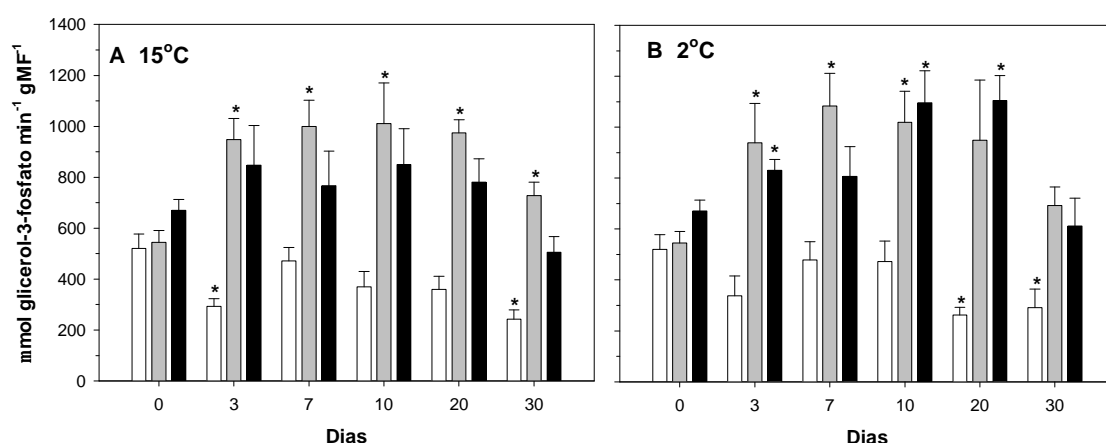


Figura 18. Atividade de aldolase ($\mu\text{mol glicerol-3-fosfato min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

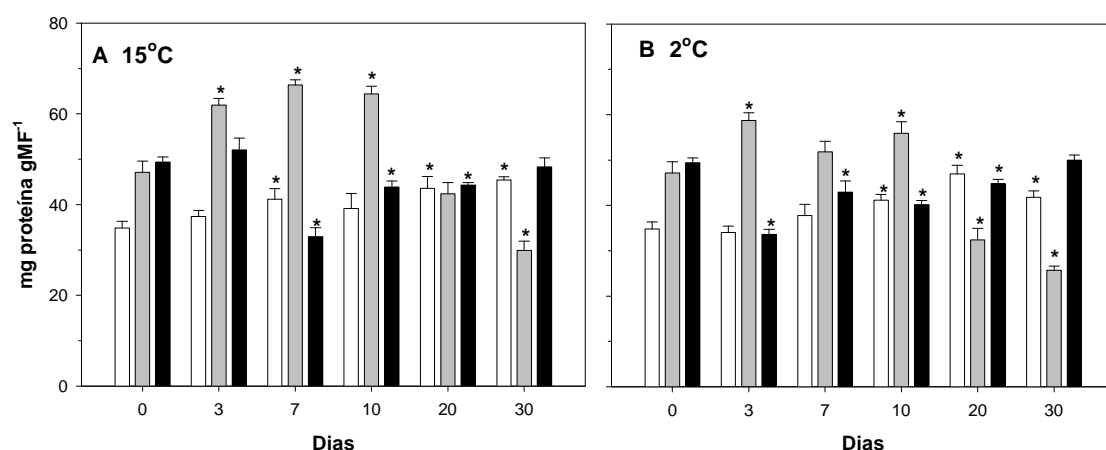


Figura 19. Teor de proteínas solúveis totais ($\text{mg proteina gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

A glutamina sintetase (GS) apresentou pequena atividade e com ténues alterações ao longo do período de armazenamento em ambas temperaturas (Figura 20), com destaque para variedade Atlantic. Da mesma forma BRIERLEY *et al.* (1997) não verificaram nenhuma dependência significativa da atividade da GS com a temperatura, no armazenamento de tubérculos a 5 e 10°C. Como a atividade da glutamina sintetase foi identificada por PEREIRA *et al.* (1996) no floema de tubérculos em desenvolvimento e maduros em brotação, e FORDE e CULLIMORE (1989) verificaram que as isoformas dessa enzima são expressas diferencialmente em células e órgãos vegetais específicos, é possível que as regiões amostradas neste ensaio não representem significativamente a atividade desta enzima. Por outro lado, existe pouca informação disponível em relação à atividade da glutamina sintetase durante o armazenamento de tubérculos de batata sob baixas temperaturas.

Os tubérculos de batata representam importante reserva de nitrogênio, tanto para formar proteínas quanto para produção de aminoácidos livres (BURTON, 1989). Os teores de aminoácidos totais, sob 15°C em Eliza mantiveram-se constantes até 20º dia de armazenamento, reduzindo-se posteriormente (Figura 21A). Já sob 2°C, ocorreram reduções aos 10 e 30 dias de armazenamento (Figura 21B). Concomitante às reduções observadas, houve aumento no teor de proteínas (Figura 19). Em Pérola também ocorreu redução aos 3 dias de armazenamento a 15°C que foi revertida posteriormente até o final do período, ao passo que sob 2°C, não houve alterações significativas nos teores de aminoácidos. Em Atlantic houve incremento nos teores de aminoácidos em ambas temperaturas, sendo mais acentuado a 2°C. É provável que em Pérola a temperatura não afete os teores de aminoácidos, porque como se verifica na Figura 19, essa variedade só apresentou queda nos teores de proteínas ao final do período de armazenamento. Portanto, parece que o tempo de armazenamento e não a temperatura, é responsável pelo metabolismo nessa variedade. BRIERLEY *et al.* (1997) verificaram que o conteúdo total de aminoácidos livres apresentou-se inicialmente estável e depois aumentou. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que o

nitrogênio pode ter sido fornecido pela degradação de proteínas insolúveis ou que o conteúdo total de nitrogênio da região central do tubérculo pode ter aumentado com o armazenamento. Desta maneira, parece que o fluxo de nitrogênio, durante armazenamento prolongado de tubérculos de batata, é mais complexo do que a mobilização direta do nitrogênio para fomentar o crescimento do broto. O metabolismo do nitrogênio parece ter relação mais estreita com o tempo de armazenamento e com a variedade estudada, isso porque os resultados obtidos em nosso trabalho mostram respostas variadas entre as variedades, porém similares dentro da mesma variedade. As variações ocorreram em função do tempo de tratamento e não da temperatura. Logo, os teores de aminoácidos e de proteínas, bem como a atividade da glutamina sintetase, não puderam ser associados diretamente com o fenômeno de “cold-sweetening”.

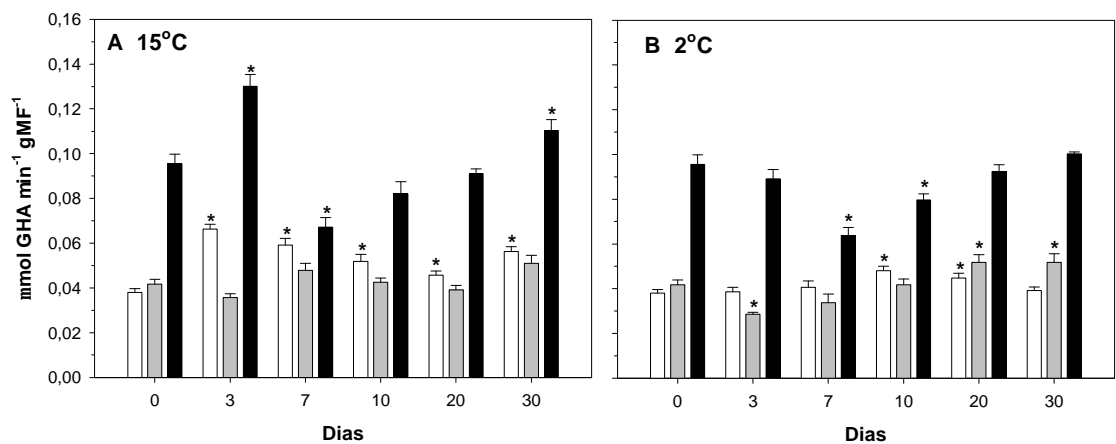


Figura 20. Atividade de glutamina sintetase ($\mu\text{mol GHA min}^{-1}\text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

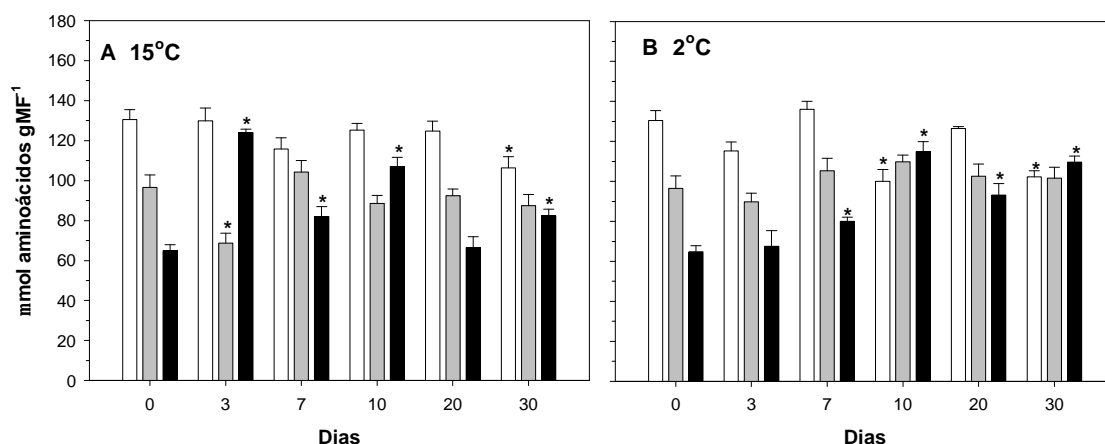


Figura 21. Teor de aminoácidos solúveis totais (μmol aminoácidos gMF^{-1}) em tubérculos de batata das cultivares \square Eliza, \blacksquare Pérola e \blacksquare Atlantic, armazenados por 30 dias a 15°C (A) e 2°C (B). As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao “dia 0 de armazenamento”, detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

RECONDICIONAMENTO

O acondicionamento não alterou os teores de amido em nenhuma das três variedades estudadas (Figura 22), embora tenha sido observada tendência de aumento nas variedades Eliza e Atlantic. A atividade da fosforilase do amido apresentou tendência de queda (Figura 22) com exceção de uma redução significativa ocorrida em Pérola aos 10 dias de armazenamento. Por outro lado, houve redução significativa na atividade das enzimas amidolíticas aos 10 dias de acondicionamento, nas variedades Pérola e Atlantic (Figura 22). Assim, como a fosforilase do amido, as atividades das enzimas amidolíticas apresentaram tendências de queda. Apesar de ter ocorrido reduções nas atividades das enzimas que promovem a degradação do amido, elas não foram suficientes para alterar significativamente os teores dessa molécula. Com base nesses resultados, parece que o acondicionamento realizado não foi efetivo, provavelmente porque o período não tenha sido longo o suficiente, e pela temperatura de exposição. De acordo com BURTON (1982) os tubérculos devem ser acondicionados sob temperaturas mais altas, por exemplo, passando de 8 para 20°C . Ao acondicionar os tubérculos de batata de 3 para

20°C, DEITING *et al.* (1998) verificaram redução significativa nos teores de sacarose, glicose e frutose; porém, não relatam se esses açúcares foram (re) incorporados na forma de amido. Sob temperaturas mais altas, pode haver redução na atividade de enzimas envolvidas no acúmulo de açúcares e por outro lado, um estímulo na atividade de enzimas que convertem sacarose em amido (ILLEPERUMA *et al.*, 1998). Também não pode ser descartada a especificidade de cada variedade em resposta a esse tratamento, como foi sendo constatado ao longo dos dados obtidos neste experimento. Assim, sugere-se que outros experimentos devam ser realizados utilizando-se temperaturas mais elevadas de acondicionamento, bem como períodos de acondicionamento mais prolongados.

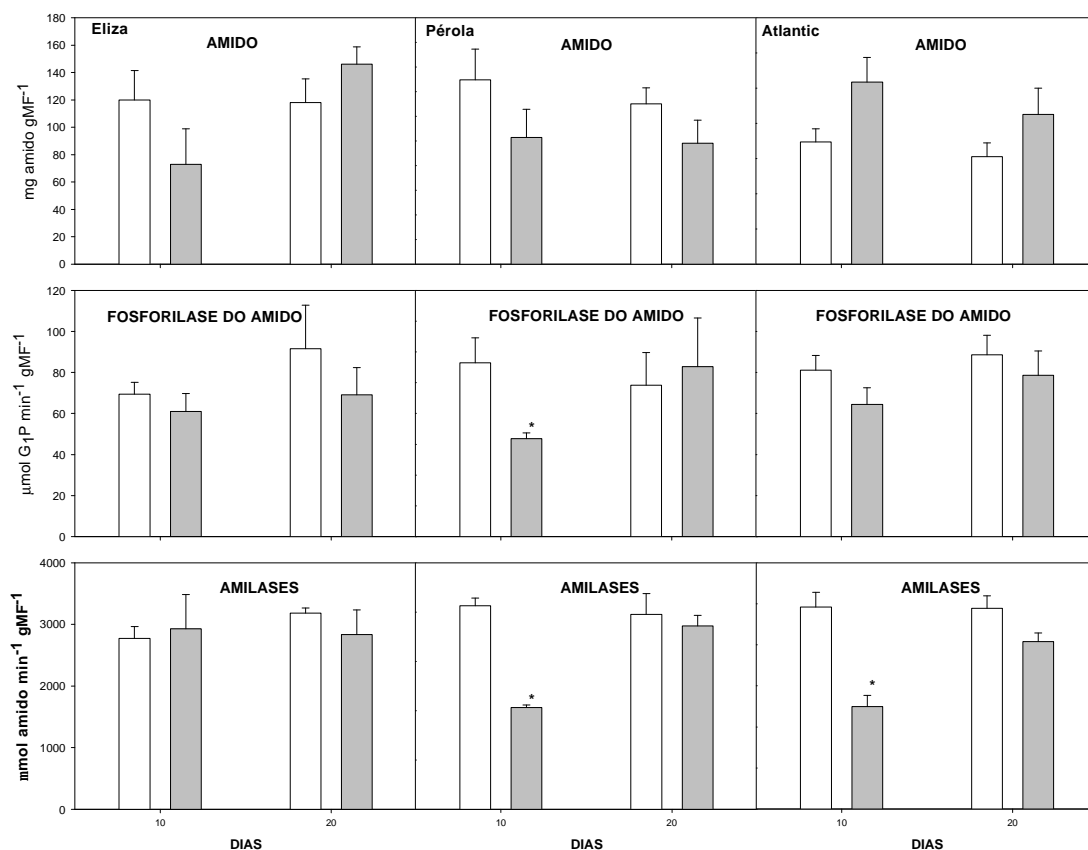


Figura 22. Teor de amido (mg amido gMF^{-1}), atividade da fosforilase do amido ($\mu\text{mol de glicose-1-fosfato min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$) e atividade amidolítica total ($\mu\text{mol amido min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares Eliza, Pérola e Atlantic, armazenados por 10 e 20 dias a \square 2°C e recondicionados por 10 e 20 dias a \blacksquare 15°C. As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o recondicionamento e o armazenamento a 2°C, detectadas pelo teste *t* ($P < 0,05$).

Na Figura 23 pode-se observar que os teores de sacarose foram reduzidos nas três variedades, a partir dos 10 dias de recondicionamento. Aos 10 dias de recondicionamento, a atividade da sacarose sintase diminuiu em Eliza e Atlantic, e a atividade da invertase ácida solúvel também foi reduzida nas variedades Eliza e Pérola (Figura 23). Aos 20 dias de recondicionamento, as variedades Eliza e Atlantic apresentaram redução da atividade da sacarose sintase e as três variedades apresentaram aumento na atividade de invertase. Esse aumento na atividade da invertase pode ser associado com as reduções observadas nos teores de sacarose nesse período (Figura 23) e também ser interpretado como necessário para suprir de hexoses a ressíntese de amido, que apresenta tendência de aumento nesse tratamento. No trabalho de ILLEPERUMA *et al.* (1998) a redução nos teores de sacarose foi acompanhada por um aumento na atividade da sacarose sintase, indicando o envolvimento dessa enzima na síntese de sacarose. No presente estudo, esse envolvimento não foi verificado, pelo contrário verificou-se redução na síntese de sacarose, bem como na atividade da sacarose sintase e da sacarose fosfato sintase.

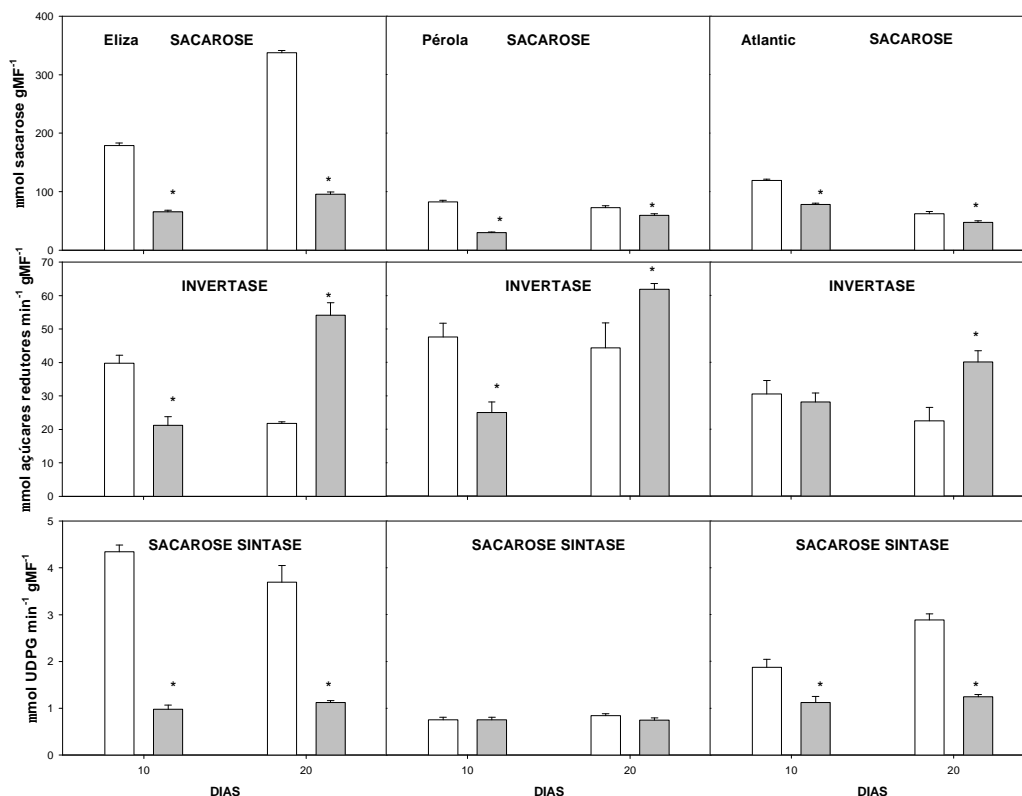


Figura 23. Teor de sacarose (μmol de sacarose gMF^{-1}), atividade de sacarose sintase (μmol UDPG min^{-1} gMF^{-1}) e atividade de invertase ácida solúvel (μmol açúcares redutores min^{-1} gMF^{-1}) em tubérculos de batata das cultivares Eliza, Pérola e Atlantic, armazenados por 10 e 20 dias a 2°C e recondicionados por 10 e 20 dias a 15°C . As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o recondicionamento e o armazenamento a 2°C , detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

A atividade máxima da sacarose fosfato sintase diminuiu nas três variedades a partir dos 10 dias de recondicionamento. Essa queda pode estar associada à queda nos teores de sacarose (Figura 24 e 23, respectivamente). Da mesma forma que a SPS, a atividade da UGPase também diminuiu significativamente na variedade Eliza ao longo todo recondicionamento (Figura 25). Em Pérola e Atlantic, a redução na atividade máxima da sacarose fosfato sintase provavelmente seja devida à redução na expressão gênica dessa enzima.

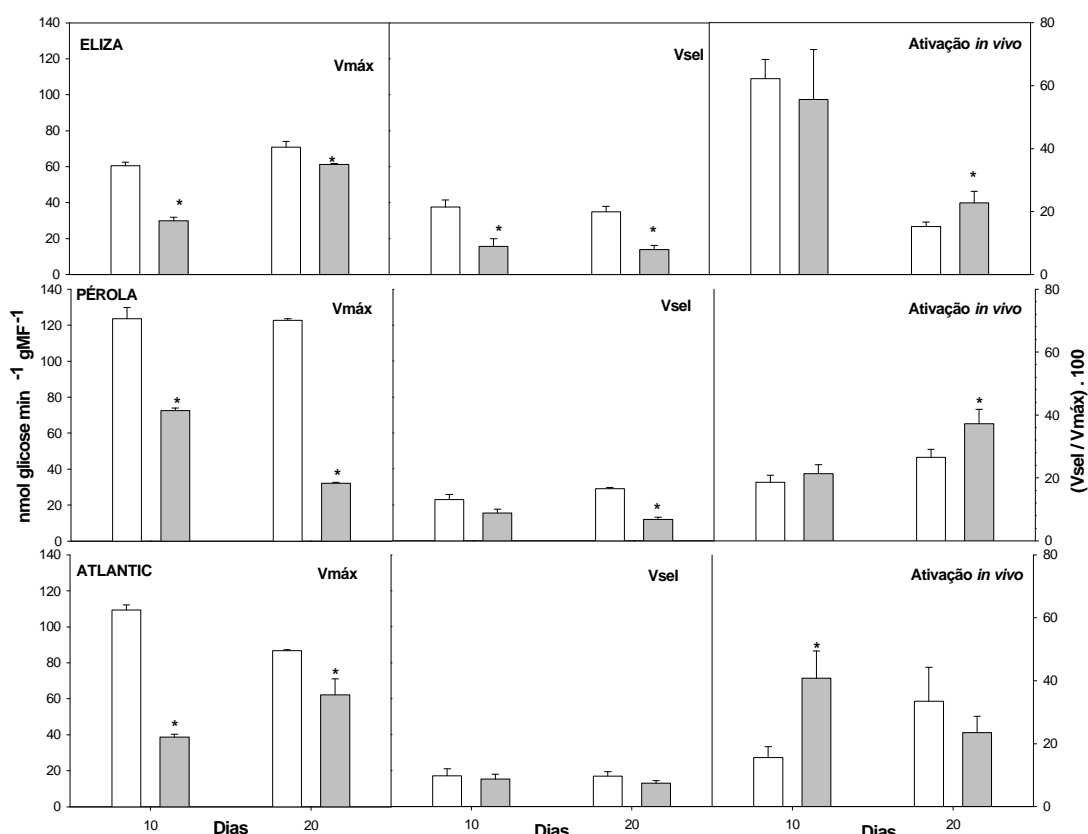


Figura 24. Atividade de sacarose fosfato sintase ($\text{nmol glicose min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata da cultivar Eliza, Pérola e Atlantic armazenados por 10 e 20 dias a \square 2°C e recondicionados por 10 e 20 dias a \blacksquare 15°C . As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o recondicionamento e o armazenamento a 2°C , detectadas pelo teste t ($P < 0,05$).

Assim como a atividade da sacarose fosfato sintase e os teores de sacarose, a atividade da UGPase diminuiu aos 10 dias, e apresentou atividades semelhantes, aos 20 dias de recondicionamento nas três variedades, àquelas sob 2°C nas variedades Pérola e Atlantic (Figuras 24, 23 e 25 respectivamente).

Os teores de glicose aumentaram na variedade Eliza aos 10 dias de recondicionamento, contrariamente ao esperado (Figura 25). Por outro lado, as variedades Pérola e Atlantic mostraram-se sensíveis ao tratamento, visto que os teores de glicose diminuíram a partir de 10 dias de recondicionamento, associando-se à queda na atividade da invertase ácida solúvel e da sacarose sintase nesse mesmo período (Figura 23). Em Atlantic, os teores de glicose diminuíram significativamente somente com 20 dias de recondicionamento, ao

passo que a variedade Eliza manteve teores semelhantes àqueles obtidos a 2°C. Reduções nos teores de açúcares, após o acondicionamento, foram verificadas em trabalhos de ILLEPERUMA *et al.* (1998) e DEITING *et al.* (1998). Desta forma, parece que as variedades Eliza e Atlantic apresentam maior dificuldade de metabolizar os açúcares redutores, o que não surpreende visto que essas variedades são caracterizadas como mais sensíveis ao “cold-sweetening”, conforme mencionado anteriormente.

A atividade da aldolase aumentou em Eliza após acondicionamento, mas não afetou os teores de glicose (Figura 25). No entanto, nas variedades Pérola e Atlantic a atividade da aldolase diminuiu significativamente aos 20 dias de acondicionamento, queda essa que poderá estar associada à diminuição nos teores de açúcares solúveis totais observada nesse período.

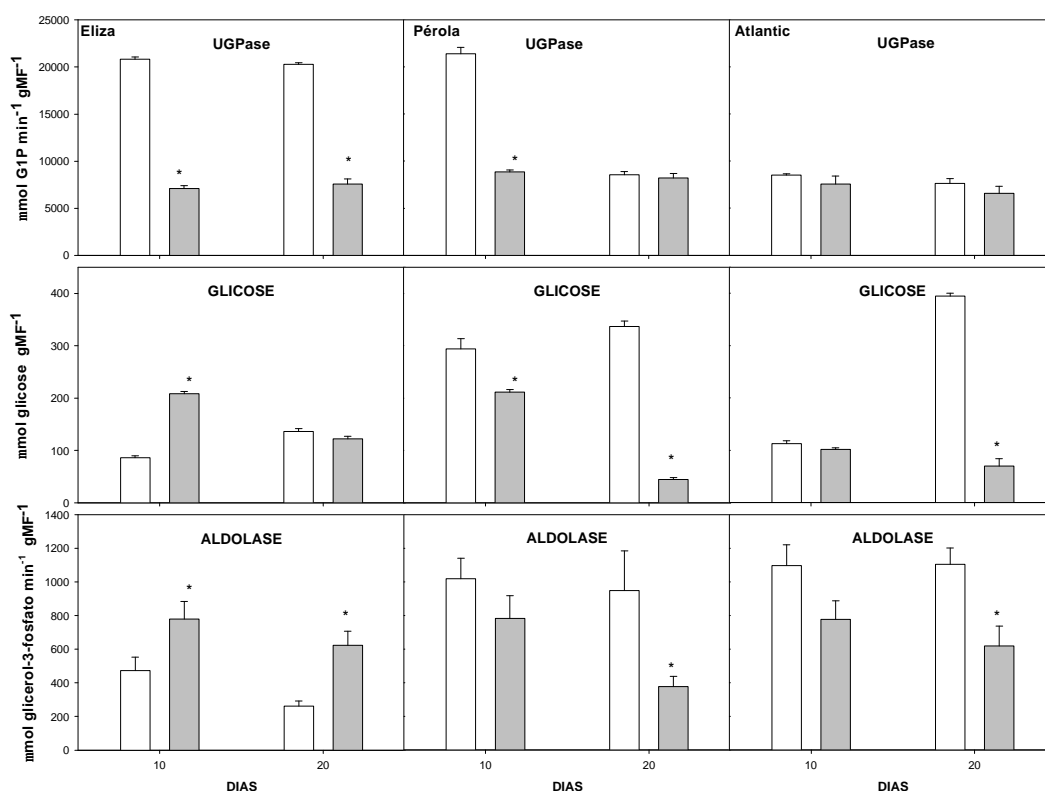


Figura 25. Atividade de UGPase ($\mu\text{mol glicose-1-fosfato min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$), teor de glicose ($\mu\text{mol glicose gMF}^{-1}$) e atividade de aldolase ($\mu\text{mol glicose-1-fosfato min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares Eliza, Pérola e Atlantic, armazenados por 10 e 20 dias a \square 2°C e acondicionados por 10 e 20 dias a \blacksquare 15°C. As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o acondicionamento e o armazenamento a 2°C, detectadas pelo teste *t* ($P < 0,05$).

A atividade da glutamina sintetase aumentou nas três variedades, durante o recondicionamento (Figura 26). Porém, nas variedades Eliza e Atlantic esse aumento não foi refletido em aumento nos teores de aminoácidos, que permaneceram semelhantes em relação aos observados sob 2°C, bem como não pôde ser associado aos teores de proteína, que sofreram aumento ao longo do tratamento (Figura 26). Por outro lado, em Pérola o aumento ocorrido aos 20 dias de tratamento nos teores de aminoácidos, estão associados com o incremento na atividade da glutamina sintetase, sendo que nesse mesmo período os teores de proteínas também aumentaram significativamente (Figura 26).

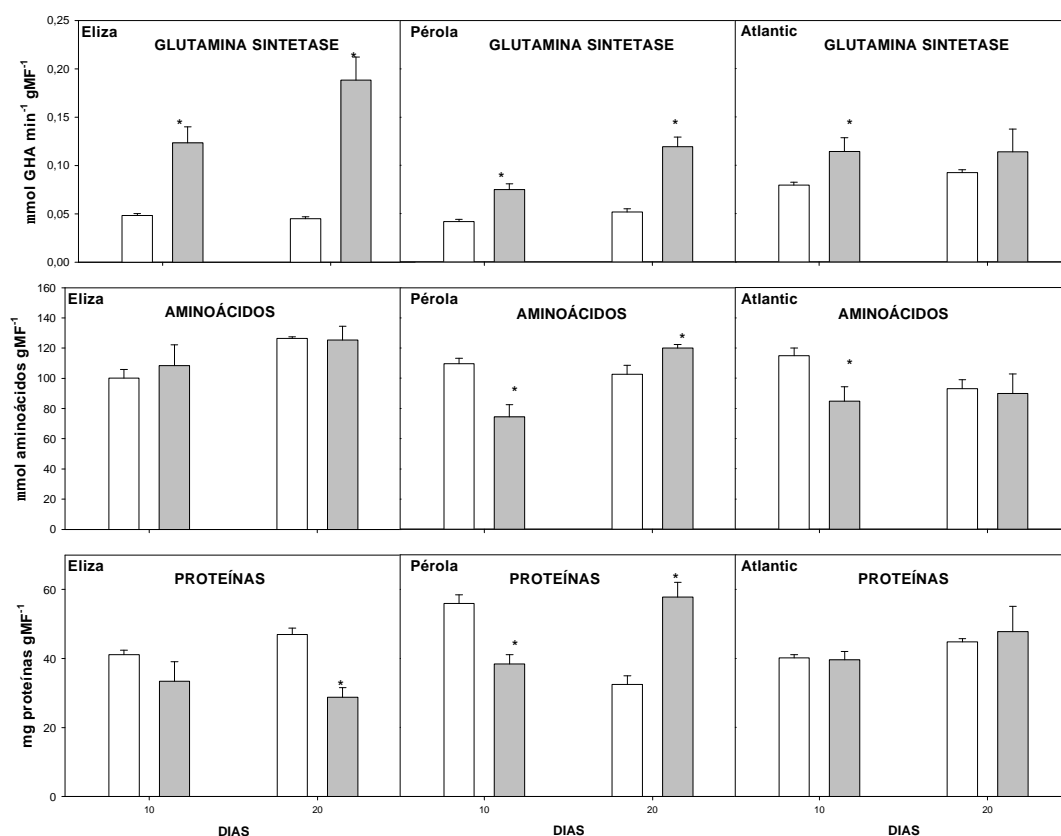


Figura 26. Atividade de glutamina sintetase ($\mu\text{mol GHA min}^{-1} \text{gMF}^{-1}$), teor de aminoácidos solúveis totais ($\mu\text{mol aminoácidos gMF}^{-1}$) e teor de proteínas solúveis totais ($\text{mg proteína gMF}^{-1}$) em tubérculos de batata das cultivares Eliza, Pérola e Atlantic, armazenados por 10 e 20 dias a \square 2°C e recondicionados por 10 e 20 dias a \blacksquare 15°C. As barras indicam o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o recondicionamento e o armazenamento a 2°C, detectadas pelo teste *t* ($P < 0,05$).

Ao longo do acondicionamento verificamos que a variedade Pérola apresentou a maior redução nos teores de glicose, na atividade da invertase, bem como na atividade da fosforilase do amido. Essa variedade tambem obteve uma redução de 50% na atividade de amilases e os menores teores de sacarose, quando comparada com Eliza e Atlantic. A queda na atividade máxima da sacarose fosfato sintase acompanhou a redução dos teores de sacarose. Os resultados obtidos sugerem uma ligação entre a menor susceptibilidade ao adoçamento, caracterizada em Pérola, com uma melhor resposta ao processo de acondicionamento. As variedades Eliza e Atlantic tambem apresentaram capacidade de redução nos teores de glicose e sacarose, bem como na atividade de algumas enzimas da via glicolítica. Porém, ainda devem ser realizados outros experimentos que permitam determinar o tempo e a temperatura ideal de acondicionamento, a fim de reverter o adoçamento dos tubérculos, causado pelo armazenamento sob baixas temperaturas. Por outro lado, muitas vezes as atividades enzimáticas mostraram-se dependentes da variedade, apresentando respostas diferenciadas. De forma interessante o aumento da atividade da invertase ácida solúvel foi muito semelhante entre as três variedades, e parece que a atividade desta enzima está associada diretamente a uma situação de estresse, visto que os tubérculos imediatamente após a colheita foram submetidos a uma temperatura baixa (2C) e posteriormente a uma nova temperatura, ou seja, acondicionados a 15C. A temperatura de acondicionamento (15C) utilizada neste trabalho, parece ser ainda muito baixa para diminuir a atividade da invertase.

O dados sobre alterações metabólicas durante o armazenamento dos tubérculos sob baixas temperaturas e o acondicionamento das variedades estudadas ainda são bastante limitados e controversos. Comparado aos estudos sobre adoçamento de tubérculos armazenados sob baixas temperaturas, as alterações metabólicas de tubérculos durante o seu acondicionamento têm merecido pouca atenção. Por outro lado, os poucos dados disponíveis na literatura são de variedades estrangeiras, cultivadas em solos e climas muito diferentes do nosso. De posse dos resultados aqui obtidos

e em futuras pesquisas, será possível ao produtor armazenar seu produto sob condições de baixa temperatura e posteriormente reverter o conseqüente efeito do “cold-sweetening” através do condicionamento. Este procedimento permitirá que sejam negociados melhores preços do produto, tanto para o produtor quanto para o consumidor, além de proporcionar à indústria e à dona de casa a aquisição de um produto processado de excelente qualidade.

CONCLUSÕES

Quando as variedades Eliza, Pérola e Atlantic são submetidas a baixas temperaturas os teores de amido diminuem, sendo observadas maiores reduções maiores na cultivar Atlantic. Esta redução foi associada a um aumento na atividade total das amilases observada nas mesmas condições, ao passo que não foi possível observar alterações significativas na atividade da fosforilase do amido. Estes resultados sugerem que a atividade amidolítica é a principal atividade degradativa do amido em tubérculos de batata. Paralelamente teores de sacarose e glicose são incrementados após exposição dos tubérculos à baixa temperatura. Menores aumentos nos teores de glicose foram observados na cultivar Pérola, a qual também apresentou os menores incrementos na atividade da amilase. Estes resultados sugerem que a degradação de amido pelas amilases pode ser um importante fator determinante do adoçamento. Diferenças no padrão de atividade de isoenzimas de amilase foram observados sob baixas temperaturas em diferentes variedades, mas essas diferenças não puderam ser associadas com diferentes níveis de atividade amidolítica ou reduções nos teores de amido. Uma significativa redução na taxa respiratória foi observada durante os primeiros dias durante o armazenamento a baixa temperatura, o qual foi seguido de um posterior aumento e redução, possuindo estas alterações um padrão semelhante em todas as variedades analisadas. O aumento temporário na respiração foi paralelo a um aumento nos teores de açúcares solúveis. Estes resultados sugerem que diferenças nas taxas respiratórias não contribuem para determinar o nível de adoçamento. As variedades diferiram entre si quanto a suas alterações nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis, as quais também variaram de acordo com o tempo de armazenamento. Entretanto não pode-se detectar nenhuma possível associação entre as diferenças no metabolismo do nitrogênio com o adoçamento. O acondicionamento dos tubérculos a 15°C esteve associado a uma redução na degradação do amido e no nível de glicose (exceto para a

cultivar Eliza) e sacarose, e à uma redução na atividade da sintase da sacarose e sacarose-fosfato sintase. A redução na atividade da invertase foi observada após o terceiro dia de acondicionamento, mas apresentou aumento no décimo dia. O acondicionamento dos tubérculos foi eficiente na redução do adoçamento das variedades Atlantic e Pérola. É possível que a redução do adoçamento na cultivar Eliza necessite de um acondicionamento a maiores temperaturas. De qualquer forma, os resultados sugerem que o acondicionamento pode melhorar a qualidade da batata para a fritura após o seu adoçamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIR, J.; KAHN, V.; UNTERMAN, M. Respiration, ATP level, and sugar accumulation in potato-tubers during storage at 4°C. **Phytochemistry**, v.16, p.1495-1498, 1977.
- BLENKINSOP, R.W; COPP, L.P.; YADA, R.Y.; MARANGONI, A.G. Changes in compositional parameters of tubers of potato (*Solanum tuberosum*) during low-temperature storage and their relationship to chip processing quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4545-4553, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-258, 1976.
- BRIERLEY, E.R.; BONNER, P.L.R.; COBB, A.H. Factors influencing the free amino acid content of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers during prolonged storage. **Journal Science Food Agricultural**, v. 70, p. 515-525, 1996.
- BRIERLEY, E.R.; BONNER, P.L.R.; COBB, A.H. Aspects of amino acid metabolism in stored potato tubers (cv. Pent land Dell). **Plant Science**, v. 127, p. 17-24, 1997.
- BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. The American Society of Plant Physiologists, 2000, 1367p.
- BURTON, W. G. *The Potato*; H. Veenman: Wageningen, The Netherlands, 1966.
- BURTON, W.L.; WILSON, A.R. **Potato Research**, v. 13, 269 p., 1970.
- BURTON, W.G. **Post-harvest physiology of food crops**. Longman, London, 1982, 339p.
- BURTON, W.G. **The Potato**. Longman Scientific and Technical, Harlow, 1989, 742p.

- CHAPPER, M. Alterações bioquímicas em tubérculos de batata armazenados sob duas condições de temperatura. Tese de Mestrado. Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 44 p., 2000.
- CHAPPER, M.; BACARIN, M.A.; PEREIRA, A.S.; TERRIBLE, L.C. Carboidratos não estruturais em tubérculos de dois variedades de batata armazenados em duas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 583-588, 2002.
- CLAASSEN, P.A.M.; BUDDE, M.A.W.; van CALKER, M.H. Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers. **Potato Research**, v. 36, p. 205 – 217, 1993.
- COCHRANE, M.P.; DUFFUS, C.M.; ALLISON, M.J.; MACKAY, G.R. Amyolytic activity in stored potato tubers. 2. The effect of low-temperature storage on the activities of α and β amylase and α - glucosidase in potato tubers. **Potato Research**, v. 34, p. 333–341, 1991.
- COFFIN, R.H.; YADA, R.Y; PARKIN, K.L.; GRODZINSKI, B. STANLEY, D.W. Effect of low temperature and chip colour of certain processing variedades and selections. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 639-645, 1987.
- COTTRELL, J.E.; DUFFUS, C.M.; PATERSON, L.; MACKAY, G.R.; ALLISON, M.J.; BAIN, H. The effect of storage temperature on reducing sugar concentration and the activities of three amyolytic enzymes in tubers of the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L. **Potato Research**, v. 36, p. 107 – 117, 1993.
- DEITING, U.; ZRENNER, R.; STITT, M. Similar temperature requirement for sugar accumulation and for the induction of new forms of sucrose phosphate synthase and amylase in cold-stored potato tubers. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, p. 127-138, 1998.
- DIXON, W.L.; ap REES, T. Identification of the regulatory steps in glycolysis in potato tubers. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1297-1301, 1980a.
- DIXON, W.L.; ap REES, T. Carbohydrate metabolism during cold-induced sweetening of potato tubers. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1653–1656, 1980b.

- DUPLESSIS, P.M.; MARANGONI, A.G.; YADA, R.Y. A mechanism for low temperature induced sugar accumulation in stored potato tubers: The potential role of the alternative pathway and invertase. **American Potato Journal**, v. 73, p.483-494, 1996.
- DUWENIG, E., STEUP, M., WILLMITZER, L., AND KOSSMANN, J. Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. **Plant Journal**, v. 12, p. 323–333, 1997.
- DWELLE, R.B.; STALLKNECHT, G.F. Respiration and sugar content of potato-tubers as influenced by storage temperature. **American Potato Journal**, v. 55, p. 561-571, 1978.
- EPPENDORFER, W. H.; EGGUM, B. O.; BILLE, S. W. Nutritive value of potato crude protein as influenced by manuring and amino acid composition. **Journal Science Food Agricultural**, v. 30, p. 361-368, 1979.
- FITZPATRICK, T. J.; PORTER, W. L. Changes in the sugars and amino acids in chips made from fresh, stored and reconditioned potatoes. **American Potato Journal**, v. 43, p. 238-247, 1966.
- FORDE, B.G.; CULLIMORE, J.V. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. **Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**, v. 6, p. 247-296, 1989.
- GABRIEL, O.; WANG, S. Determination of enzymatic activity in polyacrylamide gels. I. Enzymes catalyzing the conversion of nonreducing substrates to reducing products. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 545-554, 1969.
- GAUSING, K. AND KREIBERG, J. Potato α -amylase genes. International Patent Application WO 90/12876, 1989.
- GEINGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, v. 189, p. 329-339, 1993.
- GEINGENBERGER, P.; KRAUSE, K.-P.; HILL, L.M.; REIMHOLZ, R.; MACRAE, E.; QUICK, W.P.; SONNEWALD, U.; STITT, M. The regulation of sucrose

synthesis in leaves and tubers of potato plants. **In: *Sucrose metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology, Current Topics in Plant Physiology***, v. 14 (Eds H.G. Pontis, G.L. Salerno & E.J. Eccheverria), p. 14-24, 1995.

GEINGENBERGER, P.; REIMHOLZ, R.; GERGER, M.; MERLO, L.; CANALE, V.; STITT, M. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. **Planta**, v. 201, p. 502-518, 1997.

GERHARDT, R.; STITT, M.; HELDT, H.W. Subcellular metabolite levels in spinach leaves. Regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. **Plant Physiology**, v. 83, p. 399-407, 1987.

GREINER, S.; RAUSCH, T.; SONNEWALD, U.; HERBERS, K. Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of 11 potato tubers. Botanisches Institut, INF 360, D-69120 – Heidelberg, Germany. **Nature Biotechnology**, v. 17, cap. 7, p.708-711, 1999.

HABIB, A. T.; BROWN, H. D. Role of reducing sugars and amino acids in the browning of potato chips. **Food Technology**, v. 11, p. 85-89, 1957.

HAJIREZAEI M.; SONNEWALD U.; VIOLA R.; CARLISLE S.; DENNIS D.; STITT M. Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. **Planta**, v. 192, p. 16-30, 1994.

HILL, L.M.; REIMHOLZ, R.; SCHRÖDER, R.; NIELSEN, T.H.; STITT, M. The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, p. 1223–1237, 1996.

- HOFF, J. E.; JONES, C. M.; WILCOX, C. E.; CASTRO, M. D. The effect of nitrogen fertilization on the composition of the free amino acid pool of potato tubers. **American Potato Journal**, v. 48, p. 390-394, 1971.
- HUBER, J.L.A.; HUBER, S.C.; NIELSEN, T.H. Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.270, p. 681-690, 1989.
- HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 431-444, 1996.
- HUGHES, J. C.; FULLER, T. J. The effect of nitrogen during growth on sugar content and fry colour of cv. Record during extended storage at 10 °C. **Abstracts of the 9th Triennial Conference of the European Association of Potato Research**, p 59-60, 1984.
- ILLEPERUMA, C.; SCHLIMME, D.; SOLOMOS, T. Changes in sugars and activities of sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase during potato tuber (Russet Burbank) reconditioning at 10°C in air and 2.53 kpa oxygen after storage for 28 days at 1°C. **Journal American Society Horticultural Science**, v. 123, n. 2, p. 311-316, 1998.
- ISHERWOOD, F.A. Starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 2579–2591, 1973.
- ISHERWOOD, F.A. Mechanism of starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 33–41, 1976.
- JELLITO T.; SONNEWALD U.; WILLMITZER L.; HAJIREZEAI M.; STITT M. Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol. **Planta**, v. 188, p. 238-244, 1992.
- KAYS, S.J. Post harvest physiology of perishable plant products. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 1991, 532p.

- KENNEDY, M.G.H.; F.A., ISHERWOOD. Activity of phosphorylase in *Solanum tuberosum* during low temperature. **Phytochemistry**, v. 14, p. 667 – 670, 1975.
- KLEIN, L. B.; CHANDRA, S.; MONDY, N. I. The effect of phosphorus fertilization on the chemical quality of Katahdin potatoes. **American Potato Journal**, v.57, p. 259-266, 1980.
- KOSSMANN, J.; LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p. 171-226, 2000.
- KRAUSE, K.-P.; STITT, M. Sucrose-6-phosphate levels in spinach leaves and their effects on sucrose-phosphate synthase. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1143-1146, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARCHER, W. Ökophysiologie der Pflanze, 5th edn. **Verlag Eugen Ulmer**, Stuttgart, 1995.
- LOPES, C.A. Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.) **Instruções técnicas da Embrapa Hortaliças**, Brasília, v.8, 1997.
- LORBERTH, R.; RITTE, G.; WILLMITZER, L.; KOSSMANN, J. Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 473-477, 1998.
- MACGREGOR, A. M. Cereal α -amylases: synthesis and action pattern. In: *Seed Proteins*, p. 1–34. Daussant, J., Mose, J., and Vaughan, J., Eds., Academic Press, London, 1983.
- MARANGONI, A.G.; DUPLESSIS, P.M.; YADA, R.Y. Kinetic model for carbon partitioning in *Solanum tuberosum* tubers stored at 2°C and the mechanism for low temperature stress-induced accumulation of reducing sugars. **Biophysical Chemistry**, v. 65, p. 211-220, 1997.
- MELO, P.E. Variedades de batata potencialmente úteis para o processamento na forma de fritura no Brasil e manejo para obtenção de tubérculos

- adequados. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, p.112-119, 1999.
- MILLER, R.A.; HARRINGTON, J.D.; KUHN, C.D. Effect of variety and harvest date on sugars and chip colour. **American Potato Journal**, v. 32, p. 379-386, 1975.
- MOORE, S.; STEIN, W.H. Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, p. 367-388, 1948.
- MORRELL, S.; ap REES T. Control of the hexose content of potato tubers. **Phytochemistry**, v.25, n.5, 1073-1076, 1986.
- NELSON, D.C.; SHAW, R. Effect of planting and harvest dates, location in the hill and tuber size on sugar content of Kennebec potatoes. **American Potato Journal**, v. 53, p. 15-21, 1976.
- NIELSEN, T.H.; DEITING, U.; STITT, M. A β -amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. **Plant Physiology**. v. 113, p. 503–510, 1997.
- NOWAK, J.; SCKWIERCZ, A. Proteolytic enzyme activity in stored tubers with different rest periods. **Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.**, v. 23, p. 129-133, 1975.
- OHAD, I.; FRIEDBERG, I.; NE'MAN, Z.; SCRAMM, M. Biogenesis and degradation of starch. I. The fate of the amyloplast membrane during maturation and storage of potato tubers. **Plant Physiology**, v. 47, p. 465–477, 1971.
- PEREIRA, A.S.; CAMPOS, A. Teor de açúcar em variedades de batata (*Solanum tuberosum* L.). **Ciência Rural**, v. 29, p. 13-16, 1999.
- PEREIRA, S.; PISSARRA, J.; SUNKEL, C.; SALEMA, R. Tissue-specific distribution of glutamine synthase in potato tubers. **Annals of Botany**, v. 77, p. 429-432, 1996.

- POLLOCK, C.J.; ap REES, T. Activities of enzymes of sugar metabolism in cold-stored tubers of *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 613–617, 1975.
- PREISS, J. AND LEVI, C. Starch biosynthesis and degradation. In: *The biochemistry of plants*, v. 3, p.371–423, Carbohydrates structure and function, Preiss, J., Ed., Academic Press, San Diego, 1980.
- PRESSEY, R. Invertase inhibitor from potatoes: purification, characterization, and reactivity with plant invertases. **Plant Physiology**, v. 42, p. 1780-1786, 1966.
- PRESSEY, R. Role of invertase in the accumulation of sugars in cold stored potatoes. **American Potato Journal**, v. 46, p. 291-297, 1969.
- PRESSEY, R. Changes in sucrose synthase and sucrose phosphate synthase activities during cold storage of potatoes. **American Potato Journal**. v. 47, p. 245–251, 1970.
- PURVIS, A.C; SHEWFELT, R.L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? **Physiologia plantarum**, v. 88, p. 712-719, 1993.
- RAMMESMAYER, G.; PRAZNIK, W. Fast and sensitive simultaneous staining method of Q-enzyme, α -amylase, R-enzyme, phosphorylase and soluble starch synthase separated by starch-polyacrylamide gel. **Journal of Chromatography**, v. 623, p. 399-402, 1992.
- RATAJCZACK, L., RATAJZACK, W., & MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, n.82, p. 277-280, 1981.
- REIMHOLZ, R.; GEIGER, M.; HAAKE, V.; DEITING, U.; KRAUSE, K-P.; SONNEWALD, U.; STITT, M. Potato plants contain multiple isoforms of sucrose-phosphate synthase that shows differences in their tissue distribution, their response during development, and their response to low temperature. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 291-305, 1997.

- RICHARDSON, D.L.; DAVIES, H.V.; ROSS, H.A.; MACKAY, G.R. Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, p. 95–99, 1990.
- ROBINSON, N.L.; HEWITT, J.D.; BENNETT, A.B. Sink metabolism in tomato fruit. I. Development changes in carbohydrates metabolism enzymes. **Plant Physiology**, v.87, p. 727-730, 1988.
- ROE, M. A.; FAULKS, R. M.; BELSTEN, J. L. Role of reducing sugars and amino acids in fry colour of chips from potatoes grown under different nitrogen regimes. **Journal Science Food Agricultural**, v. 52, p. 207-214, 1990
- SARGEANT, J. G. The α -amylase isoenzymes of developing and germinating wheat grain. In: *The biochemistry of cereals*, p. 339-343, New York: Academic Press, 1979.
- SASAKI, T.; TADOKORO, K.; SUSUKI, S. Multiple forms of invertase of potato tuber stored at low temperature. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2047-2050, 1971.
- SECHLEY, K.A.; YAMAYA, T.; OAKS, A. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. **International Review of Cytology**, v. 134, p. 85-163, 1992.
- SHERMANN, M.; EWING, E.E. Temperature, cyanide, and oxygen effects on the respiration, chip color, sugars, and organic-acids of stored tubers. **American Potato Journal**, v. 59, p.165-178, 1982.
- SIEGL, G.; MACKINTOSH, C.; STITT, M. Sucrose phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. **FEBS Letters**, v. 270, p. 198– 202, 1990.
- SMITH, A. M. AND DENYER, K. Tansley review No. 39: Starch synthesis in developing pea embryos. **New Phytology**, v. 122, p. 21–33, 1992.
- SMITH, O. Chemical composition of the potato. In: *Potatoes: Production, Storing, Processing*; Smith, O., Ed.; Avi Publishing: Westport, CT, p. 59-109, 1968.

- SOLOMOS, T.; LATIES, G.G. The mechanism of ethylene and cyanide action in triggering the rise in respiration in potato tubers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 54, p. 506 – 511, 1975.
- SOWOKINOS, J.R. Maturation of *Solanum tuberosum* L.I. Comparative sucrose and sucrose synthase levels between several good and poor processing varieties. **American Potato Journal**, v.50, p. 234-237, 1973.
- SOWOKINOS, J.R.; LULAI, E.C.; KNOPER, J.A. Translucent tissue defects in *Solanum tuberosum* L. I. Alterations in amyloplast membrane integrity, enzyme activities, sugars and starch content. **Plant Physiology**, v. 78, p. 489–494, 1985.
- SOWOKINOS, J.R. Stress induced alterations in carbohydrate metabolism. In: VADA, M.E.; PARK, W.D. (Eds.). **The molecular and cellular biology of the potato**. CAB International, Wallingford, 1990. 137p.
- SOWOKINOS, J.R. Effect of stress senescence on carbon partitioning in stored potatoes. **American Potato Journal**, v.67, p.849-857, 1990.
- SOWOKINOS, J.R. Allelic and isozyme patterns of UDP-glucose pyrophosphorylase as a marker for cold-sweetening resistance in potatoes. **American Journal of Potato Research**, v. 78, p. 57-64, 2001.
- STEUP, M. Starch degradation. In: *The biochemistry of plants* v. 14, p. 255–295, **Academic Press**, San Diego, 1988.
- STITT, M. Metabolic regulation of photosynthesis. In: *Advances in Photosynthesis*, v. 3, *Photosynthesis and Stress* (Ed N. Baker). **Academic Press**, London, 1997.
- SUH, S.G.; PETERSON, J.E.; STIEKEMA, W.J.; HANNAPEL, D.J. Purification and characterization of the 22-kilodalton potato tuber proteins. **Plant Physiology**, v. 94, p. 40-45, 1990.
- SWEETLOVE, L.J., BURRELL, M.M., AP REES, T. Characterization of transgenic potato (*Solanum tuberosum*, L.) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. **Biochemistry Journal**, v. 320, p. 487–492, 1996a.

- SWEETLOVE, L.J., BURRELL, M.M., AP REES, T. Starch synthesis in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. **Biochemistry Journal**, v. 320, p. 493–498, 1996b.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 3^a. Ed. **Sinauer Associates, Inc.**, 690p., 2002.
- TALLEY, E. A.; FITZPATRICK, T. J.; PORTER, W. L. Chemical composition of potatoes. VIII. Effect of variety, location, and year of growth on the content of nitrogen compounds. **American Potato Journal**, v. 47, p. 231-244, 1970.
- THILL, C.A.; PELOQUIN, S.J. Inheritance of potato chip color at the 24-chromosome level. **American Potato Journal**, v. 71, p. 629-646, 1994.
- TRETHEWEY, R. N.; GEIGENBERGER, P.; RIEDEL, K.; HAJIREZAEI, M.-R.; SONNEWALD, U.; STITT, M.; RIESMEIER, J. W.; WILLMITZER, L. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. **The Plant Journal**, v. 15, p. 109-118, 1998.
- TREVANION, S.J.; KRUGER, N.J. Effect of temperature on the kinetic properties of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase from potato tuber. **Journal of Plant Physiology**, v. 137, p. 753–759, 1991.
- UPPAL, D.S.; VERMA, S.C. Changes in sugar content and invertase activity in tubers of some Indian potato varieties stored at low temperature. **Potato Research**, v. 33, p. 119-123, 1990.
- VAN ES, A.; HARTMANS, K. J. Starch and sugars during tuberization, storage and sprouting. In: *The Storage of Potatoes*; Rastovski, A., van Es, A., et al. Eds.; Centre for Agricultural Publishing and Documentation; Wageningen, The Netherlands, p 79-113, 1981.
- VIOLA, R.; DAVIES, H.V. Effect of temperature on pathways of carbohydrate-metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L) **Plant Science**, v. 103, p.135, 1994.

- VLIET, W.F.; van SCHRIEMER, W.H. The sugar accumulation of potatoes kept at low temperature, as studied in a small selection of samples of Dutch varieties. **European Potato Journal**, v.3, p.263-271, 1960.
- WALKER, G. J. AND HOPE, P. M. The action of some α -amylases on starch granules. **Biochemistry Journal**, v. 86, p.452– 462, 1963.
- WISMER, W.V. Sugar accumulation and membrane related changes in two variedades of potato tubers stored at low temperature. **Ph.D. thesis**. University of Guelph, 1995.
- WITT, W. AND SAUTER, J. J. Purification and properties of a starch granule-degrading α -amylase from potato tubers. **Journal Experimental Botany**, v. 47, p. 1789-1795 , 1996.
- YU, T.-S., KOFLER, H., HÄUSLER, R. E., HILLE, D., FLÜGGE, U.-I., ZEEMAN, S. C., SMITH, A. M., KOSSMANN, J., LLOYD, J., RITTE, G., ET AL. The Arabidopsis *sex1* Mutant Is Defective in the R1 Protein, a General Regulator of Starch Degradation in Plants, and Not in the Chloroplast Hexose Transporter. **Plant Cell**, v.13, p. 1907–1918, 2001.
- ZEEMAN, S. C., UMEMOTO, T., LUE, W-L., AU-YEUNG, P., MARTIN, C., SMITH, A. M., AND CHEN, J. A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen. **Plant Cell**, v. 10, p. 1699–1711, 1998a.
- ZHOU, D. Biochemical aspects of low oxygen storage of potato tubers at low temperatures and molecular cloning of potato acid invertase. **Ph.D. dissertation**. University of Maryland, College Park. 1994.
- ZIEGLER, P., DAUSSANT, J., AND LOOS, K. Development of α -amylase activity and polymorphism in wheat seedling shoot. **Journal of Experimental Botany** v. 45, p.1147– 1155, 1994.
- ZRENNER, R.; STITT, M. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 14, p. 939-946, 1991.

ZRENNER, R.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Analysis of the expression of potato uridinephosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. **Planta**, v. 190, p. 247-252, 1993.

ZRENNER, R.; SALANOUBAT, M.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum*, L.). **Plant Journal**, v. 7, p. 97-107, 1995.

ZRENNER R.; SCHÜLER K.; SONNEWALD U. Soluble acid invertase determines the hexose to sucrose ratio in cold-stored tubers. **Planta**, v. 198, p. 246-252, 1996.