

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**VARIABILIDADE GENÉTICA
DA RESISTÊNCIA AO FRIO DOS MICROTÚBULOS
CORTICAIS EM DIFERENTES VARIEDADES E
POPULAÇÕES DE *Secale cereale* L.**

Maria Paula Albuquerque Figueiredo Simões

Lisboa
1995

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**VARIABILIDADE GENÉTICA
DA RESISTÊNCIA AO FRIO DOS MICROTÚBULOS
CORTICAIS EM DIFERENTES VARIEDADES E
POPULAÇÕES DE *Secale cereale* L.**

Maria Paula Albuquerque Figueiredo Simões

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para efeitos de obtenção de Mestrado de Produção Vegetal sendo apresentado no Instituto Superior de Agronomia

Lisboa
1995

Agradecimentos

A todos os que, pelo seu contributo tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

À Sr^a. Dr^a. Wanda Viegas, Professora do Instituto Superior de Agronomia, pela disponibilidade de meios laboratoriais, sugestões e ambiente de trabalho.

Ao Sr^o. Eng^o. Agrónomo Álvaro Queiroz pelos ensinamentos técnicos e científicos, pela constante disponibilidade quer no esclarecimento de dúvidas quer no acompanhamento do trabalho e leitura crítica do trabalho.

À Sr^a. Dr^a. Leonor Morais pelo ânimo, ajuda laboratorial e disponibilidade.

Ao Sr. Eng^o. Agra Coelho pela disponibilidade e apoio no tratamento estatístico.

À Universidade de Trás-os-Montes, nomeadamente aos Sr^{os} Professores Henrique Guedes Pinto e Olinda Carnide pela cedência de material vegetal bem como informações sobre o seu comportamento morfológico.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco pela disponibilidade de meios e facilidades concedidas para a realização do Curso de Mestrado e elaboração da tese.

Aos colegas da Escola Superior Agrária com quem mais directamente convivo, e às técnicas do laboratório de Biologia, por toda a ajuda concedida.

Muito Obrigado

Dedicatória

A progressão na carreira é um anseio particularmente saudável quando tal é conseguido por mérito próprio quer de trabalho ou capacidades particulares e desde que não se faça à custa do prejuízo de outrém.

O grau de mestre é indispensável à continuação da carreira docente de Ensino Superior Politécnico. A sua realização representa para o docente não só o transpor de uma meta imprescindível, como também uma actualização de conhecimentos, o voltar novamente ao papel de aluno, e o seu lançamento numa nova carreira - a de investigação.

Durante a frequência do Mestrado o docente passa então a desempenhar uma grande diversidade de papéis e responsabilidades - o de professor, o de aluno e o de investigador. Se ainda adicionarmos a vida particular de cada um no papel de cônjuge e pai/mãe é com algum esforço que se consegue superar todas e tão diversas actividades.

Mas, se é possível realizar / concretizar tecnicamente tão diversificadas tarefas talvez não seja tão acessível quando em cada, sem descurar nenhuma, se coloca afectividade e dedicação.

É tendo em conta o atrás exposto que dedico este meu trabalho não só à minha família - Rui, Laura e Duarte - como também a todas as mulheres que, com grande humanidade conseguem manter um grande equilíbrio emocional no seio familiar e profissional, pois só esse equilíbrio e estabilidade permitirá um desempenho dedicado das tarefas a realizar.

Resumo

Neste trabalho procurou-se avaliar a resistência ao frio dos microtúbulos corticais em diferentes variedades e populações de centeio (*Secale cereale* L.). Para tal as sementes de duas variedades oriundas da Alemanha, uma oriunda da Polónia e duas populações regionais de Portugal foram incubadas a 20°C, 8°C (1h, 4h e 24h) e 4°C (1h, 4h, 24h) e pela técnica de imunofluorescência foi visualizado o padrão de microtúbulos corticais.

Verificou-se homogeneidade de comportamento intervarietal nas modalidades de 20°C e 8°C e 4°C (1h e 4h), mas na modalidade de 4°C-24h o comportamento entre as variedades e/ou populações diferia significativamente entre si.

A comparação do padrão de microtúbulos corticais e o comportamento morfológico em termos de crescimento radicular revelou existir correlação entre os dois parâmetros. Variedades com baixo crescimento radicular a 4°C não apresentavam microtúbulos resistentes ao frio no final de 24h a 4°C, enquanto as populações e variedades que apresentavam maior crescimento radicular a baixas temperaturas ou curvas de crescimento radicular semelhantes a 8°C e 4°C apresentavam microtúbulos resistentes ao frio no final de 24h a 4°C.

Palavras chave: Microtúbulos corticais; Sensibilidade ao frio; variabilidade genética; *Secale cereale*; Crescimento radicular; Imunofluorescência.

Abstract

The aim of the present work was to evaluate the resistance of the cortical microtubules to cold in different varieties and populations of rye (*Secale cereale* L.). In order to accomplish that, two varieties of seeds native to Germany, one variety of seeds native to Poland and seeds of two Portuguese populations were incubated at 20°C, 8°C (1h, 4h and 24h) and 4°C (1h, 4h and 24h) and using the indirect immunofluorescence technique the pattern of cortical microtubules was assessed.

The homogeneity of the intervarietal behaviour in the 20°C, 8°C and 4°C (1h and 4h) treatments was observed. However, in the 4°C-24h treatment the behaviour among the varieties and/or populations varied significantly.

The comparison of the cortical microtubules pattern and the root growth showed a correlation between the two parameters. The varieties showing a low root growth at 4°C did not show cortical microtubules resistant to cold after 24h at 4°C; while both the populations and the varieties which showed a superior root growth at low temperatures or curves of root growth similar at 8°C and at 4°C showed microtubules which were resistant to cold after 24h at 4°C.

Key words: Cortical microtubules; Sensibility to cold; Genetic variability; *Secale cereale*; Root growth; Immunofluorescence.

Lista de Abreviaturas

- ABA** - Ácido abscísico
- ATP** - Adanosina trifosfato
- BPP** - Banda pré-profásica
- DAPI** - 4',6'-diamino-2-fenilindol
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- EGTA** - etilenoglicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-ácidotetracético
- EMT**- Microtúbulos endoplasmáticos
- FITC** - Fluorocromo de fluoresceína
- GA3** - Ácido giberélico
- GDP** - Guanosina difosfato
- GTP** - Guanosina trifosfato
- MAP** - Proteínas associadas aos microtúbulos
- MD** - Muitos microtúbulos e desorganizados
- MFC** - Microfibrilhas de celulose
- MO** - Muitos microtúbulos e organizados
- mRNA** - Transcrito de ácido ribonucleico
- MT** -Microtúbulos
- MTC** - Microtúbulos corticais
- MTNS** - Local de nucleação de microtúbulos
- MTOC** - Centros de organização de microtúbulos
- MTSB** - 50 mM de PIPES [piperazina-N,N'-bis(ácido dietano-sulfónico)], 5 mM
MgSO₄ (sulfato de magnésio hepta-hidratado), 5 mM EGTA
[etilenoglicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetracético], pH 6,9
- PD** - Poucos microtúbulos e desorganizados
- PO** - Poucos microtúbulos e organizados
- RCV** - Reguladores de crescimento vegetal

Índice

Resumo	
Lista de abreviaturas	
Lista de quadros	
Lista de figuras	
1. Introdução	1
2. Objectivo	3
3. Caracterização dos microtúbulos	4
3.1. Constituição	4
3.2. Isótipos de tubulina	5
3.3. Instabilidade dinâmica	7
3.4. Proteínas Associadas aos Microtúbulos (MAP)	10
3.5. Centros de organização de Microtúbulos (MTOC)	12
4. Padrões nas células vegetais	15
4.1. Microtúbulos corticais (MTC)	16
4.2. Fuso acromático	22
4.3. Banda pré-profásica	24
4.4. Fragmoplasto	26
5. Material e métodos	28
5.1. Material vegetal	28
5.2. Curvas de crescimento	29
5.3. Observação do padrão de microtúbulos	30
5.3.1. Técnica de fixação e marcação	30
5.3.2. Metodologia estatística	32
5.4. Metodologia estatística	34
6. Resultados	35
6.1. Curvas de crescimento	35
6.2. Padrão de organização de microtúbulos corticais	36
6.2.1. Modalidade 20°C	36
6.2.2. Modalidade 8°C	37
6.2.3. Modalidade 4°C	38
6.2.4. Modalidade 20°C <i>versus</i> 8°C e 4°C	41
7. Discussão	42
8. Conclusões	50
Referências bibliográficas	51
Anexos	57

Lista de Quadros

Quadro 1 - Valores da estatística para comparação das curvas de crescimento a 4°C e 8°C.

Quadro 2 - Número de células nos diferentes padrões de organização que cada variedade/ população apresentou na modalidade de 20°C.

Quadro 3 - Valores de χ^2 na avaliação de homogeneidade intravarietal na modalidade 20°C.

Quadro 4 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade de ocorrência para análise de homogeneidade intervarietal a 20°C.

Quadro 5 - Número de células nos diferentes padrões de organização que cada variedade/ população apresentou na modalidade de 8°C.

Quadro 6 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade na modalidade 8°C

Quadro 7 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade de ocorrência para análise de homogeneidade intervarietal a 8°C.

Quadro 8 - Número de células nos diferentes padrões de organização que cada variedade/ população apresentou na modalidade de 4°C.

Quadro 9 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade na modalidade 4°C

Quadro 10 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade de ocorrência para análise de homogeneidade intervarietal a 4°C.

Quadro 11- Contribuição de cada variedade/ população para o valor de χ^2 da modalidade 4°C-24horas.

Quadro 12 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade na comparação entre as diferentes temperaturas de incubação.

Lista de Figuras

- Fig.1** - Disposição dos microtúbulos ao longo de um ciclo celular.
- Fig. 2** - Microtúbulos Corticais em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos antitubulina. A-Face lateral que sofre alongamento; B-Face de topo. Ampliação 135x.
- Fig. 3** - MT constituindo a Banda pré-profásica em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos antitubulina. A-BPP; B-Aproximação dos MT à região perinuclear formando um cesto. Ampliação 85x.
- Fig. 4** - MT constituindo o fuso acromático em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos antitubulina. A-MT; B-cromossomas visualizados com DAPI. Ampliação 135x.
- Fig. 5** - MT constituindo o fragmoplasto em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos antitubulina. A-MT; B-cromossomas visualizados com DAPI. Ampliação 135x.
- Fig. 6** - Origem das variedades e populações de centeio.
- Fig. 7** - Visualização de MT em células de ápices radiculares de centeio por imunofluorescência com anticorpos antitubulina. A-Padrão MO (Muitos e Organizados); B-Padrão PO (Poucos mas Organizados); C-Padrão MD (Muitos mas desorganizados); D-Padrão PD (Poucos e desorganizados).
- Fig. 8**- Percentagem de células nos diferentes padrões de organização na modalidade 4°C-24h. Esquema comparativo entre variedades/ populações.
- Fig. 9** - Percentagem de células nos diferentes padrões de organização dos MTC na modalidade 20°C e 4°C (1hora; 4horas; 24horas).
- Fig. 10** - Curvas de crescimento radicular das variedades/ populações Dank nowe, Gambit, Lordelo, Padrela e Rapid a 4°C e 8°C.
- Fig. 11** - Células de ápices radiculares de centeio tratadas com anticorpo antitubulina. Célula metafásica em que houve despolimerização dos MT constituintes do fuso. Variedade Rapid, modalidade 4°C-1h. Ampliação 135x. A-Marcação antitubulina; B-Dapi.

1. Introdução

O ácido desoxirribonucleico (DNA) constitui o suporte universal de toda a informação genética que define as características de cada organismo vivo (Lechner e Ribeiro, 1992). No entanto, para que esse material se transmita de célula em célula é necessário que ocorra a sua replicação, que culmina na duplicação cromossômica, e ocorra também o processo mitótico que envolve a correcta separação dos cromatídeos.

A duplicação do DNA é levada a cabo por um conjunto de proteínas que actua com precisão, conexão e complementaridade, mas a sua separação em duas células filhas, está dependente de uma estrutura igualmente precisa - o fuso acromático - cujo principal constituinte são os microtúbulos.

Os microtúbulos (MT) fazem parte de um conjunto de estruturas filamentosas que formam o citoesqueleto, sendo na globalidade responsáveis pela manutenção e/ou alteração da forma da célula, e tendo um papel importantíssimo na divisão celular. Estes dois últimos aspectos, forma da célula e plano de divisão celular revestem-se de particular importância nas células vegetais devido à sua forma mais rígida comparativamente às células animais, estando deles dependente a morfologia final do organismo.

A compreensão do funcionamento das estruturas do citoesqueleto e das suas interligações com outras estruturas celulares toma pois aspectos particulares quando consideramos o reino vegetal, tendo sido alvo de aturada atenção por parte de grande número de cientistas. O grande impulso verificado recentemente na técnica de imunofluorescência, tem permitido um avanço significativo não só no conhecimento destas estruturas como no do seu funcionamento.

As células de zonas meristemáticas, tendo elevado índice mitótico apresentam um padrão de MT altamente dinâmico comparativamente com as células que não sofrem divisão (Fosket, 1992). Alterações de comportamento celular nas regiões meristemáticas terão necessariamente maiores repercussões no organismo comparativamente a regiões não meristemáticas, uma vez que à divisão se segue a diferenciação. Sendo os MT estruturas altamente dinâmicas nestas regiões, al-

terações do seu comportamento por influência de factores externos poderão ser determinantes no comportamento (e eventualmente adaptação) dos organismos.

2. Objectivo

A temperatura é um dos factores externos com grande influência na estabilidade e organização dos MT. A temperaturas inferiores a 10°C começa a fazer-se sentir uma despolimerização dos MT (Weingarten *et al.*, 1975), até atingir uma despolimerização praticamente total próximo do 0°C, dependendo da espécie e órgão em causa (Bartolo e Carter, 1991-b; Baluska *et al.*, 1993-b).

No entanto, não só se verificam diferenças no grau de resistência dos MT à temperatura conforme a espécie e o tecido em causa, como também se verificam fenómenos de aclimação, ou seja, o surgimento de MT resistentes ao frio após certos períodos de incubação a baixas temperaturas. Se existe variabilidade de comportamento dos MT entre diferentes tecidos (meristemático, epiderme, endoderme) e também entre espécies, será que haverá homogeneidade de comportamento entre diferentes variedades da mesma espécie?

Foi tentando dar a nossa ajuda para a elucidação desta questão que se realizou este trabalho, cujo objectivo é contribuir para a avaliação do comportamento dos MT corticais de diferentes variedades de centeio (*Secale cereale*) quando sujeitos a stress térmico, procurando averiguar se haverá diferenças comportamentais entre variedades da mesma espécie, ou seja se existe variabilidade genética.

Para além do exposto procura-se correlacionar uma possível variabilidade genética, caso ela se verifique, com o comportamento morfológico apresentado pelas diferentes variedades / populações utilizadas, bem como com as condições da região de que são oriundas. Será que plantas provenientes de locais com invernos mais rigorosos terão diferenças de comportamento no que respeita à resistência dos MT a baixas temperaturas relativamente a plantas adaptadas a regiões de invernos mais amenos?

3. Caracterização dos Microtúbulos

3.1. Constituição

Os Microtúbulos (MT) são polímeros de α e β tubulina, polipéptidos globulares de ~50 kDa com grande afinidade entre si que se associam em heterodímeros $\alpha\beta$ tubulina com aproximadamente 120 kDa. Estes heterodímeros, em condições favoráveis, polimerizam de uma forma direcional $\alpha\beta \rightarrow \alpha\beta \rightarrow \alpha\beta$, formando protofilamentos. Conjuntos de 13 protofilamentos justapostos lateralmente e na mesma direcção e dispostos em anel constituem um MT, com um diâmetro exterior de aproximadamente 24 nm, interior de 13 a 15 nm e de comprimento variável, podendo ser mais ou menos extenso (10-25 μ m) (Dustin, 1980).

As α e β tubulinas são semelhantes entre si (36 a 42% de homologia) cada uma das quais com aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos (Pousada e Soares, 1992)

Excepto em estruturas como os axónios ou nos cílios e flagelos os MT caracterizam-se por grande instabilidade dinâmica, podendo polimerizar ou despolimerizar por influência de diversos factores (Ferreira, 1992). Um grande número de factores que contribuem para a sua polimerização / despolimerização são conhecidos, mas o grande desafio é saber como a célula dirige esse processo permitindo ou determinando a ocorrência de factos no tempo e no espaço, factos esses directamente responsáveis pela morfogénese da própria célula.

Os MT existem em todas as células eucariotas, tanto vegetais como animais, mas embora estruturalmente semelhantes e desempenhando funções comuns nestes dois tipos de células eles diferem nalguns aspectos tanto em termos de constituição como no padrão de organização e nalgumas funções. No entanto, devido à maior facilidade de isolar tubulina a partir de células nervosas, muitos dos estudos sobre microtúbulos de células vegetais tem sido realizados por comparação com os estudos realizados em células animais.

3.2. Isótipos de tubulina

O padrão de separação de α e β tubulina nas plantas superiores é inverso ao dos animais. Enquanto nos animais a α -tubulina é mais pesada que a β -tubulina, nas plantas a α -tubulina posiciona-se à frente de β -tubulina em gel de poli-acrilamida (Gull *et al.*, 1986). Este facto, inversão da tubulina foi primeiro descrito em *Physarium* por Clayton e colaboradores (1980)(citado por Gull *et al.*, 1986).

As tubulinas formam uma super família de proteínas relacionadas que compreende pelo menos três famílias: α -tubulina, β -tubulina e γ -tubulina (Pousada e Soares, 1992). Embora a sequência de aminoácidos de alguns domínios tenha sido altamente conservada ao longo da cadeia filogenética, foi possível detectar diferenças, por vezes muito pequenas, numa mesma família de tubulina, originando variantes dentro de cada família. Essas variantes (detectada já em diversos organismos) podem ser devidos à existência de vários genes, designando-se nesse caso por isótipos, ou ter origem em modificações pós-traduccionais e designam-se por isoformas (Gull *et al.*, 1986; Pousada e Soares, 1992).

Segundo Pousada e Soares (1992), γ -tubulina não entra na constituição dos microtúbulos, estando localizada nas estruturas responsáveis pela organização dos MT, os MTOC (do inglês Microtubule Organizing Center - Centros Organizadores de MT).

Liu e colaboradores (1993), utilizando um anticorpo para um polipéptido de γ -tubulina altamente conservado, conseguiram identificar e purificar um polipéptido de 58 KDa existente em células de tabaco em cultura. O tratamento de três tipos de plantas com o anticorpo desenvolvido para esse polipéptido relacionado com γ -tubulina, permitiu verificar a presença do antigene ao longo do ciclo celular, com maior incidência junto ao núcleo no final da prófase, na região proximal dos polos durante a formação do fuso, bem como junto à extremidade (-) dos MT constituintes do fragmoplasto.

Um facto curioso é que, os diferentes isótipos de tubulina existentes num mesmo organismo, não têm sempre o mesmo nível de expressão. Segundo Gull e colaboradores (1986) em *Daucus carota*, existem 6 isótipos de β -tubulina que se expressam em diferentes locais da planta, nomeadamente: β_5 -tubulina está pre-

sente nas partes vegetativas com máxima expressão nas folhas; todos os órgãos florais excepto o pólen têm os isótipos β_1 , β_2 , β_3 , sendo o isótipo β_4 aquele que apresenta maior expressão no pólen; o isótipo β_6 apenas se expressa no estado de plântula.

Utilizando a técnica de “Southern blotting” em *Physarum*, Schedl e colaboradores (citado por Gull *et al.*, 1986) demonstraram a presença de 3 *loci* para β -tubulina (betA, betB e betC), para apenas dois isótipos de β -tubulina (β_1 e β_2 isótipos). Estes últimos diferem apenas no resíduo de aminoácido presente na posição 283, que pode ser alanina ou serina. Em virtude da diferença ser tão pequena não se notava uma nítida separação destes dois isótipos no gel de acrilamida.

Para além da expressão em diferentes estados de desenvolvimento, pode haver alteração dos isótipos que se estão a exprimir em dado momento, quando a planta é sujeita a stresses, nomeadamente a variação de temperatura. Kerr and Carter (1990-b) referem que, quando plantas de centeio são incubadas a 4°C relativamente a 22°C, se verifica uma alteração do nível de expressão dos diferentes isótipos de α e β -tubulina, sendo essa alteração mais acentuada para α -tubulina do que para β -tubulina.

Também Chu e co-autores (1993), utilizando *Arabidopsis thaliana* referem alteração dos isótipos de α e β -tubulina quando se comparam plantas incubadas a 25°C relativamente a 4°C. Contrariamente ao registado para o centeio é no nível de β -tubulina que se verifica maior alteração. A alteração no nível de expressão parece ser controlada ao nível de transcrição, sendo os mRNA de β -tubulina com maior expressão mais resistentes às baixas temperaturas.

Okamura e colaboradores (1993) trabalhando em cultura de células de cenoura do tipo GD2, verificaram que existem duas formas de β -tubulina (β I e β II) e que, quando a cultura era sujeita a períodos de frio passando de 26°C para 4°C, se verificava no final de quatro dias de tratamento uma alteração entre a razão β I/ β II. Com efeito, no início do tratamento a razão era de 0.69 aumentando para 1.85 depois de quatro dias a 4°C, o que indica uma maior estabilidade de β I a baixas temperaturas. A razão descia gradualmente durante o período de recuperação até atingir o valor inicial após 24 horas a 26°C. Ambas as tubulinas, β I e β II, apresentavam níveis de concentração decrescentes durante o período de frio não havendo significativa diferença no nível do conjunto proteico. O autor denomina β I e β II tubulinas como isoformas que, como já foi dito anteriormente, têm origem, não

em genes diferentes, mas em modificações pós-traducionais, dentro das quais se conta a acetilação, tirosinação e glutaminação das α -tubulinas e fosforilação e glutaminação das β -tubulina (Cleveland, 1990 citado por Chu *et al.*, 1993). No entanto, estes últimos autores referem que este tipo de modificações não tinha ainda sido confirmados em células vegetais.

3.3. Instabilidade dinâmica

A polimerização dos MT ocorre por adição de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina às extremidades dos protofilamentos. Devido à estrutura polarizada do dímero, e ainda à sua polimerização direcional, os MT tem também uma estrutura polarizada, tendo as suas extremidades propriedades ligeiramente distintas, distinguindo-se uma extremidade (+) onde a polimerização e despolimerização se faz a uma taxa superior, e uma extremidade (-) onde a taxa de polimerização / despolimerização é mais baixa. Normalmente a extremidade (-) de um MT está ancorada ou estabilizada nos MTOC que evitam ou controlam a despolimerização (Alberts *et al.*, 1989). Os MTOC serão focados com mais pormenor nas páginas subsequentes.

A polimerização da tubulina em MT depende (como factores endógenos):

- da concentração de subunidades livres de $\alpha\beta$ -tubulina, existindo uma concentração crítica a partir da qual ocorre espontaneamente a polimerização. A concentração crítica pode ser alterada por diversos factores, nomeadamente a presença de proteínas associadas aos MT (MAP) (Sloboda *et al.*, 1976).
- da concentração de GTP (Guanosina trifosfato), pois para integrarem um MT as subunidades de $\alpha\beta$ -tubulina têm de estar ligadas a um destes nucleótidos fosforilados. Ambas as tubulina, α e β , têm domínios de ligação a nucleótidos fosforilados GTP. A ligação de GTP a α -tubulina é muito forte e do tipo irreversível, sendo reversível no caso de β -tubulina. Segundo Pousada e Soares (1992) é possível que a inacessibilidade que se verifica no domínio de ligação de α -tubulina a GTP esteja relacionada com a forte ligação existente entre as subunidades que constituem o dímero $\alpha\beta$ -tubulina. O domínio de li-

gação a GTP de β -tubulina deverá encontrar-se exposto num protofilamento em crescimento.

A hidrólise de GTP a GDP (Guanosina difosfato) só ocorre após polimerização, ou seja, só ocorre quando as subunidades estão integradas no MT, dependendo a taxa de polimerização da quantidade de subunidades com nucleótidos não hidrolizados que formam uma capa de protecção (Alberts *et al.*, 1989). Se todas as subunidades incorporadas sofrerem hidrólise dos nucleótidos, então o MT sofre rápida despolimerização independentemente de outros factores favoráveis à polimerização (Gunning *et al.*, 1982). A concentração deste nucleótido é pois, um factor que influencia o equilíbrio.

- da presença de MAP que se ligam à parede externa do polímero influenciando a sua estabilidade (Hugdahl *et al.*, 1993) e interacção com outros componentes celulares (Gunning *et al.*, 1982).
- da concentração de Ca^{2+} . Elevada concentração de Ca^{2+} leva à despolimerização dos MT (Darnell *et al.*, 1990; Schellenbaum *et al.*, 1992).

Oosawa e Asakura, 1975 (citado por Hugdahl *et al.*, 1993) afirmam que a polimerização ocorre em dois passos: a nucleação e o alongamento. A nucleação envolve a associação lateral de pequenos oligómeros de tubulina, formando estruturas de pré-nucleação que continuam a crescer por associação lateral até um núcleo de 13 protofilamentos estar completo. O alongamento ocorre por adição de $\alpha\beta$ tubulina ou oligómeros a estes núcleos.

Nos MT, a manutenção de um estado mais duradouro ou mais efémero está intimamente relacionada com as MAP que lhe estão associadas.

Como factor externo que directamente influencia a estabilidade dos MT há a destacar a temperatura. Baixas temperaturas, aproximadamente $0^{\circ}C$ ou inferiores levam à despolimerização dos MT, dependendo da espécie (Bartollo e Carter, 1990-a) e tecido em causa (Baluska *et al.*, 1993-b). Em raiz de *Azolla* 15 minutos a $0^{\circ}C$ conduzem à despolimerização dos MT, enquanto em células de cotilédones de tomate bastam 8 horas a $5^{\circ}C$ para ocorrer a despolimerização (Ilker *et al.*, 1979 citado por Kerr e Carter, 1990-a).

O mecanismo pelo qual a temperatura afecta a estabilidade dos MT ainda não está esclarecido. No entanto verificam-se fenómenos de alteração da resistên-

cia dos MT a determinada temperatura após períodos de aclimação, tendo sido realizados vários estudos que contribuem para o esclarecimento desta questão.

Kerr e Carter (1990-a) utilizando a variedade Puma de *Secale cereale* verificaram que, no final de dois dias a 4°C, o padrão de MTC era semelhante ao observado a 22°C. No entanto, após esses dois dias a 4°C, o comportamento dos MTC a mais baixas temperaturas era diferente dos MTC das plantas sem os dois dias de aclimação, conseguindo despolimerizar mais rapidamente quando sujeitas a temperaturas negativas. Um estudo mais detalhado revelou que os isótipos de α e β -tubulina que constituíam os MTC não se encontravam na mesma proporção, quando se comparavam plantas aclimatadas *versus* plantas não aclimatadas. Essa alteração era ainda mais significativa no final de quatro dias a 4°C, quando α_5 e α_6 -tubulina, bem como β_7 -tubulina, deixavam de entrar na constituição dos MT, aparecendo um novo isótipo- α_8 -tubulina (Kerr e Carter, 1990-b).

Em *Arabidopsis thaliana*, Chu e co-autores (1993) também registaram alterações na expressão génica para β -tubulina quando as plantas foram incubadas a 4°C. Os autores chamam a atenção para o facto de, ser a nível da transcrição que se dá a regulação, verificando-se um decréscimo no nível de transcrição de TUB6 e TUB8 a baixas temperaturas, enquanto o nível de transcrito de TUB9 era maior a 4°C relativamente a 25°C. O acréscimo do nível de TUB9 mRNA era devido não só a um nível mais elevado de síntese, como também a um menor "turnover" do transcrito a 4°C.

Também Okamura e colaboradores (1993) verificaram, através do efeito do frio na sincronização dos ciclos celulares em cultura de células de cenoura, que havia alteração dos isótipos de β -tubulina contituíntes dos MT no final de cinco dias a 4°C. Os autores não registaram o aparecimento de novos isótipos mas sim uma alteração da razão $\beta I/\beta II$ -tubulina.

A resistência dos MT ao stress térmico parece nestes casos estar correlacionada com a presença ou ausência de determinados isótipos.

Mizuno (1992), trabalhando com cultura de células de tabaco, também verificou a presença de MT resistentes ao frio relacionando essa resistência não com a presença de diferentes isótipos, mas com uma acção de cinases que actuariam por um processo de fosforilação / desfosforilação em estruturas filamentosas associadas ao longo do comprimento dos MT.

O papel das MAP na regulação da resistência ao frio dos MT não será nunca de excluir. No entanto, a dificuldade que se tem verificado no seu isolamento, tem atrasado a investigação nesse sentido.

Bartolo e Carter (1992), utilizando folha de espinafre, levantam a hipótese dos MT não serem lábeis ao frio por si só, mas o seu comportamento ser consequência da variação da “pool” citoplasmática de Ca^{2+} . Utilizando o Li^+ , um inibidor do aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, os autores observaram um índice de polimerização dos MT próxima dos 100% em células de plantas expostas a 0°C e -2°C quando incubadas com Li^+ . Em face dos resultados obtidos, os autores consideram que o Ca^{2+} poderá ser um mediador da temperatura no comportamento dos MT, podendo essa mediação ser levada a cabo através da tubulina propriamente dita ou de MAP.

O papel do Ca^{2+} como mediador não pode, no entanto, ser considerado como único pois que, tubulina purificada e polimerizada *in vitro*, despolimeriza a baixas temperaturas.

3.4. Proteínas Associadas aos Microtúbulos (MAP)

Para além do heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina e de GTP a polimerização dos MT, bem como o seu comportamento, parece estar intimamente relacionado com proteínas que com eles se associam conferindo-lhes diferentes propriedades. Este grupo de proteínas toma a designação genérica de MAP (do inglês Microtubule Associated Proteins, proteínas associadas aos MT).

Uma característica comum a todas as MAP é o facto de se associarem aos MT numa taxa constante, revelando uma disposição periódica ao longo de toda a estrutura dos MT (Sloboda *et al.*, 1976). Gunning (1982) refere como características principais das MAP o facto de se ligarem à tubulina, copurificarem com ela, e estimularem a sua polimerização *in vitro*. Fosket e colaboradores (1992) referem, citando o trabalho de Hirokawa *et al.* (1988), que, quando os MT são examinados microscopicamente, eles aparecem ligados a vesículas, outros MT ou a membranas, através de massas globulares ou mais ou menos filamentosas, identificadas como MAP.

As MAP são essenciais à polimerização dos MT copolimerizando com a tubulina em ciclos sucessivos de polimerização / despolimerização, embora, sob determinadas condições, possa conseguir-se polimerizar *in vitro* a tubulina purificada (Fosket *et al.*, 1992). *In vivo*, os MT são sempre constituídos não só por tubulina como por MAP (Fosket *et al.*, 1992) que, não só estabilizam os MT contra a

despolimerização, como servem de mediadores na interacção com outros componentes celulares (Alberts *et al.*, 1989).

O estudo das MAP levou ao seu agrupamento em três grandes classes: as de elevado peso molecular, com peso molecular entre 200.000 a 300.000 Da (HMW); as proteínas tau (τ) com 40.000 a 60.000 Da; e ainda uma classe de proteínas específicas, vulgarmente designadas por proteínas motoras. Estas últimas são as responsáveis pela deslocação de vesículas ou mesmo organelas ao longo dos MT e pelo movimento de MT relativamente uns aos outros. Um exemplo deste tipo de proteínas é a cinesina e a dineína citoplasmática (Fosket *et al.*, 1992; Gunning *et al.*, 1982). A dineína encontra-se nos cílios e flagelos, estando envolvida no movimento dos MT relativamente uns aos outros através de uma actividade Mg^{2+} -ATPase dependente.

As proteínas tau foram primeiro identificadas por Sloboda (1976) que demonstrou a sua indispensabilidade na polimerização dos MT.

Para a caracterização bioquímica das MAP é primeiro necessário isolá-las, o que em células vegetais se reveste de particular dificuldade devido à menor concentração de tubulina e também devido à actividade proteolítica deste tipo de célula. Os estudos têm sido realizados por comparação com as MAP de origem animal nomeadamente a partir da purificação da tubulina cerebral. A utilização de anticorpos desenvolvidos para as MAP associadas a essa tubulina cerebral, as quais englobam as MAP1 a 5 de elevado peso molecular, não tem obtido resultados positivos, o que indica que possa ter ocorrido grande divergência na sua evolução. Verifica-se, no entanto, ligação das MAP de origem cerebral aos MT das células vegetais, indicando que os domínios de ligação aos MT possam ter sido conservados (Fosket *et al.*, 1992).

Normalmente nas MAP podem distinguir-se vários domínios, um envolvido na ligação aos MT e outro(s) domínio(s) envolvidos na ligação a outros componentes celulares ou ATPases. Gunning e co-autores (1982) caracterizam a MAP2 referindo-a como uma projecção intimamente ligada a uma proteína com actividade motora e ainda um domínio que promove a nucleação (ligando-se à parede dos MT), ambos os domínios com locais de fosforilação.

Se a diversidade de funções dos MT pode advir dos diferentes isótipos de tubulina, como já se fez referência, a maior contribuição poderá, no entanto, advir do tipo de MAP que lhe está associado, e provavelmente, dos possíveis sinais regulatórios por elas mediados (Fosket *et al.*, 1992).

Outra função das MAP, embora não esteja ainda convenientemente esclarecida, é o seu papel na conexão dos MT com outros elementos do citoesqueleto, nomeadamente actina e filamentos intermédios, que no seu conjunto, constituem uma rede intracelular.

O comportamento dos MT depende não só da sua estabilidade como da sua interacção com outros componentes celulares nomeadamente a membrana plasmática. Durante largos anos, embora sem demonstração inequívoca, se atribuiu essa função a possíveis MAP. Recentemente Laporte e colaboradores (1993), trabalhando com membrana plasmática de *Nicotiana sylvestris*, verificaram que a tubulina entrava numa proporção significativa na constituição do plasmalema, podendo ser considerada como uma proteína intrínseca da sua constituição. Os autores observaram ainda que, quando as membranas purificadas eram tratadas com orizalina (um destabilizante dos MT *in vitro*) (Morejohn *et al.*, 1987 citado por Laporte *et al.*, 1993), não tinha qualquer efeito na quantidade de tubulina que integrava a membrana, o mesmo não acontecendo se células vivas sofressem o mesmo tratamento, verificando-se, neste caso, uma drástica redução da tubulina constituinte da membrana. Tais resultados indicam que, em lugar das MAP, poderá ser a tubulina constituinte da membrana a desempenhar um papel importante na interacção membrana-MT.

3.5. Centros de Organização de Microtúbulos (MTOC)

Nas células animais existe uma estrutura identificada como responsável pela nucleação e organização dos MT- o centrossoma - que contém os centríolos. Os centríolos são eles próprios constituídos por MT, têm DNA próprio, e são capazes de se autorreplicar (Loewy *et al.*, 1991). Quando a célula inicia o processo mitótico, uma das características da prófase é a duplicação dos centríolos e a migração de um par para o lado oposto do fuso acromático, sendo cada um dos pares responsável pela nucleação e estabilização dos MT constituintes do fuso, nomeadamente os MT cinetocoriais e os MT polares, bem como MT astrais, que ligam os polos do fuso ao plasmalema (Mader, 1993).

Os centríolos foram utilizados por Mitchison e Kirschner (1984-a) para demonstrar a polimerização dos MT *in vitro*. Utilizando preparações de α e β tubulina que, por si só, não conseguiam polimerizar (excepto em elevadas concen-

trações - Mitchison e Kirschner, 1984-b), os autores conseguiram polimerizar a tubulina em MT quando procederam à sua incubação com material centrossomal, tendo a sua origem nesse mesmo material.

Mas, nas células de vegetais superiores não existem centríolos e desde cedo a pergunta surgiu: qual a estrutura responsável pela nucleação e estabilização ou ancoragem da extremidade (-) nas células vegetais? Existe um MTOC principal que muda de configuração durante o ciclo celular, como sugeriu Mazia (1987)(citado por Stoppin *et al.*, 1994), ou múltiplos MTOC?

Duas principais correntes de opinião surgiram quanto aos locais de nucleação dos MT corticais. Clayton e colaboradores (1985) e Wick (1985), citados por Hasezawa e Nagata (1993) propõem que a nucleação se processa na região perinuclear alongando-se até à face interna da membrana celular, organizando-se em MT corticais. Gunning e colaboradores (1978) trabalhando com células de raiz de *Azolla* e Hogetsu (1987)(citados por Nagata *et al.*, 1994) propõem que os MTOC se localizam no cortex da célula, distinguindo a nucleação e a organização como processos temporalmente distintos.

Lloyd (1987) sugere que, para além da nucleação e organização serem eventos distintos, a região perinuclear é o local de nucleação, ou seja o local onde se dá a iniciação da polimerização designando-o por MTNS (do inglês Microtubule Nucleation Site, local de nucleação dos MT), e a organização dependente da interacção MT-MT e MT-membrana plasmática.

Em 1994, Nagata e colaboradores, trabalhando com cultura de células de tabaco, conseguiram através da utilização de afidicolina e propizamida uma grande sincronização do ciclo celular, podendo realizar estudos mais detalhados na passagem da fase M para a fase G1, e portanto seguir o modo como se processa a nucleação e organização. Após a telofase, eles observaram a presença de MT na região perinuclear que se alongavam em direcção à extremidade distal do plano de divisão, ou seja, com orientação mais ou menos paralela ao eixo maior da célula. Assim que os MT atingiam a extremidade distal do plano de divisão iniciava-se o aparecimento de MT corticais junto à zona proximal do plano de divisão celular com orientação perpendicular ao eixo maior da célula. Os autores fazem notar a falta de continuidade dos MT que se originam na região perinuclear e os MT corticais perpendiculares ao eixo de alongamento. Estas observações revelaram dois passos para a formação dos MT corticais. No primeiro passo os MT são formados na região perinuclear a expensas da decomposição do fragmoplasto, alongando-se paralelamente ao eixo maior da célula até atingir a parte distal do plano de di-

visão. O segundo passo compreende a formação de MT perpendiculares ao eixo maior da célula que se estendem a todo o comprimento celular, constituindo o padrão típico dos MT corticais. Os autores propõem que os primeiros MT têm origem na região perinuclear e os segundos na região do cortex celular.

Mais ou menos simultaneamente os mesmos autores estudaram o envolvimento de uma proteína de 49kDa na nucleação dos MT. Com efeito utilizando anticorpos desenvolvidos para uma proteína de 51kDa presente em ouriço-do-mar em material centrossomal envolvido na nucleação de MT em células animais, Hasezawa e Nagata (1993) conseguiram isolar uma proteína de 49kDa presente em células vegetais.

Utilizando a técnica de imunofluorescência os autores observaram o aparecimento de sinal junto à região perinuclear durante a formação dos MT com orientação paralela ao eixo maior da célula, e na região do cortex celular aquando da formação dos MT transversais, registando ainda, que essa proteína devia ser transportada da região perinuclear para a região cortical ao longo de microfilamentos, pois não só se colocalizava com eles como também se acumulava no citoplasma quando se utilizava citocalasina D (inibidor da polimerização de actina). Os autores concluem que esta proteína deverá ser um dos constituintes dos MTOC ou um MTOC propriamente dito.

4. Padrões de Microtúbulos nas Células Vegetais

Como resultado da investigação realizada sabe-se, actualmente, que nas células vegetais os MT apresentam-se em diferentes padrões de organização ao longo do ciclo celular, que vai da interfase passando pela divisão mitótica até à nova interfase. Dentro desse ciclo podemos distinguir quatro etapas principais onde os MT que constituem o citoesqueleto apresentam um padrão de disposição característico.

Em células meristemáticas, de ciclo celular frequente, através da técnica da imunofluorescência, pode observar-se na célula em interfase uma disposição dos MT junto à face interna da membrana citoplasmática, com justaposição mais ou menos paralela e direcção perpendicular ao eixo de alongamento da célula - os **microtúbulos corticais (MTC)**.

No final da interfase, os MT que se dispunham junto à membrana plasmática, mais ou menos uniformemente distribuídos pelas quatro faces que sofrem alongamento, agrupam-se numa banda mais estreita designada por **banda pré-profásica (BPP)**.

No final da prófase, antes de se romper a membrana nuclear observa-se grande concentração de MT junto ao núcleo, formando uma malha que o envolve, frequentemente designado por cesto. Ao romper-se a membrana nuclear os MT organizam-se na formação do **fuso acromático** e no final da anafase aparece uma nova estrutura junto ao local de formação da nova superfície de membrana e parede que irá separar as duas células filhas - o **fragmoplasto** (Fig.1).

Fosket e colaboradores (1992) referem ainda um quinto padrão - os microtúbulos radiais - em que os MT irradiam da região perinuclear para o citoplasma na preparação para a divisão ou após a citocinese. Os mesmos autores referem que, em células de endosperma de monocotiledóneas, sem parede celular, os MT apresentam sempre um padrão radial. Baluska e co-autores (1992) referem

também esta apresentação dos MT designando-os por Microtúbulos Endoplasmáticos - EMT (do inglês Endoplasmic Microtubules).

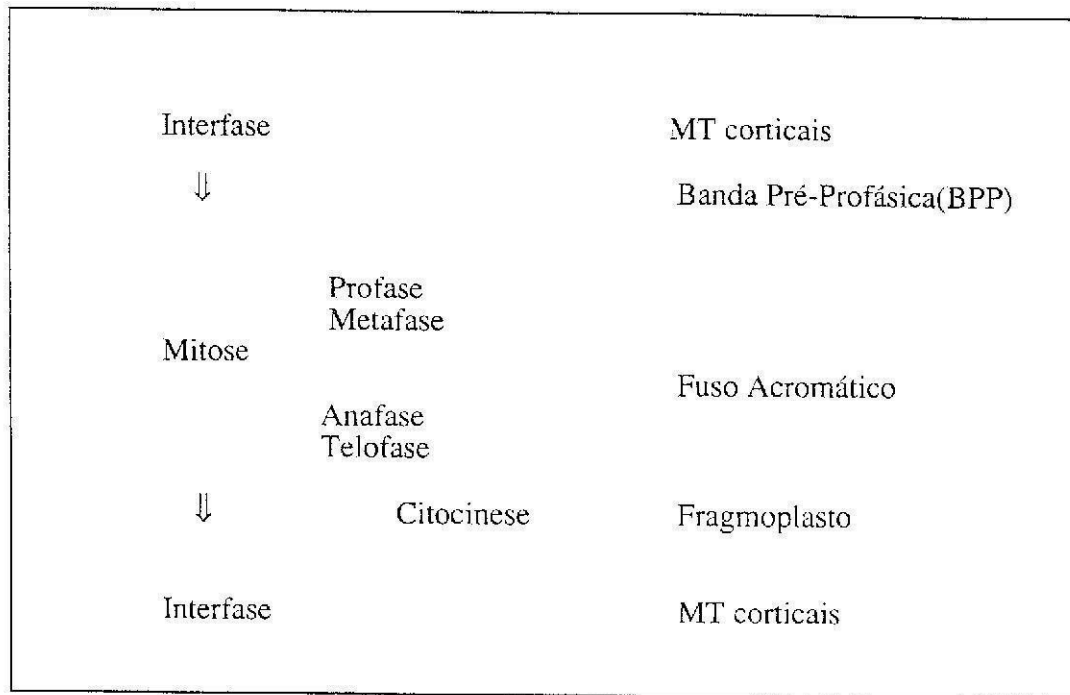


Fig.1 - Disposição dos microtúbulos ao longo de um ciclo celular.

4.1. Microtúbulos corticais (MTC)

Na célula interfásica observa-se uma disposição dos MT junto à face interna da membrana citoplasmática. Essa disposição é de paralelismo entre o conjunto dos MT, e de orientação perpendicular ao eixo de alongamento da célula. Este padrão verifica-se nas faces que sofrem alongamento, pois nas faces de topo os MT apresentam uma menor densidade e dispõem-se casualmente (Fig 2 A, B).

Segundo Lloyd (1987), a disposição destes MT corticais segundo uma hélice é mais viável do que uma disposição em anel. A disposição em hélice é mais coerente com a variação de ângulos que podem ser observados. O modelo helicoidal realça o facto dos MT corticais funcionarem como um todo. Observações de

Baluska e co-autores (1993-a) são também consistentes com este modelo helicoidal.

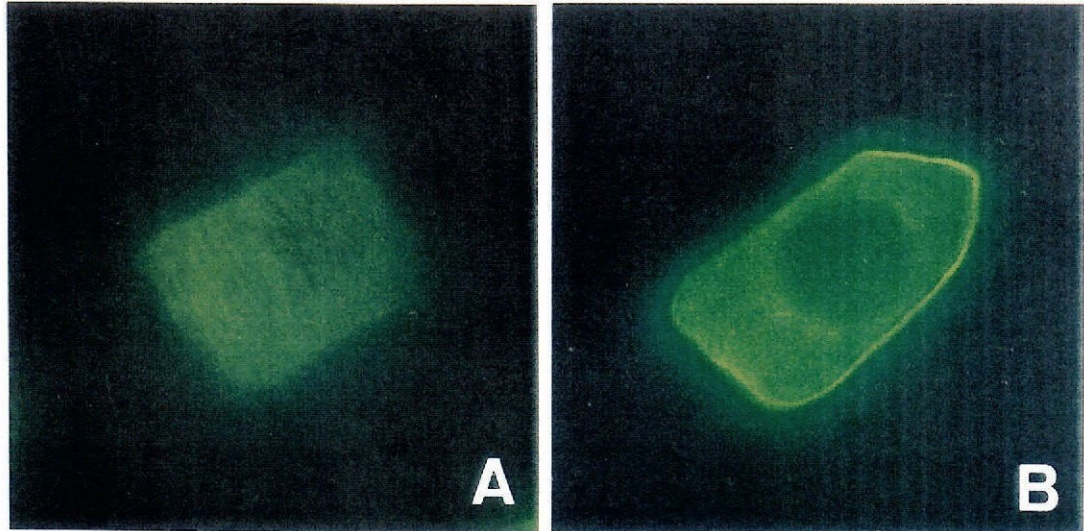


Fig. 2 - Microtúbulos Corticais em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos antitubulina. A-Face lateral que sofre alongamento; B-Face de topo. Ampliação 135x.

Nas células meristemáticas esta disposição dos MT é frequentemente semelhante à que se verifica para as microfibrilas de celulose (MFC) que constituem a parede celular e da qual depende a expansão celular. Gunning e colaboradores (1982), Lloyd e colaboradores (1985), e Shibaoka (1994) afirmam que os MT corticais servem de orientação na deposição das MFC constituintes da parede, sendo estas últimas responsáveis pela morfogénese das células.

Em 1979 Marchant, utilizando colquicina e coumarina (inibidores da síntese de MT e celulose respectivamente) realça o papel da parede celular na determinação da forma da célula, pois que, ao incubar protoplastos de *Mougeotia* com coumarina eles mantêm a forma esférica e não cilíndrica, que lhes é característica enquanto os MT não sofrem alteração. A incubação com colquicina, leva à formação de parede, mas mantendo a forma esférica devido à deposição desordenada das MFC.

Eletheriou (1994) utilizando ápices radiculares de *Triticum aestivum* e ainda tirando partido da colquicina, estudou o seu efeito na deposição das MFC

em células de protofloema, tendo verificado que, na ausência de MT resultante do tratamento com colquicina, as MFC eram depositadas desordenadamente, estreitando os poros de ligação às células companheiras e também os plasmodesmos. O autor propõe, embora não haja prova inequívoca, que a ausência de MT leva a ruptura dos mecanismos de orientação para as vesículas do complexo de Golgi transportadoras de material de parede e de complexos sintetizadores de celulose, que em lugar de depositarem o seu conteúdo nos locais correctos o fazem indiscriminadamente em qualquer lugar, levando à deposição desordenada das MFC e ao estreitamento dos poros de ligação às células companheiras.

Emons e colaboradores (1992) chamam a atenção para o facto de que as principais provas científicas de que os MT orientam as MFC, advêm do uso de agentes inibidores da polimerização da tubulina como seja a colquicina. Os autores advertem que a colquicina não tem efeitos exclusivos nos MT podendo actuar, entre outros, no nível da fluidez da membrana. O efeito da aplicação de colquicina nas MFC da parede em células em crescimento foram diversos e por vezes contraditórios, nomeadamente:

- disposição casual das MFC (Schnepf *et al.*,1975 citado por Emons *et al.*,1992);
- deposição das MFC em redemoinho (Hepler and Fosket,1971, citado por Emons *et al.*,1992);
- deposição ordenada semelhante à situação sem tratamento (Emons *et al.*,1986 citado por Emons *et al.*,1992);
- deposição ordenada, mas sem as mudanças de orientação que ocorrem regularmente nas células sem tratamento (Grimm *et al.*,1976, citado por Emons *et al.*,1992);
- deposição ordenada numa orientação diferente da original (Emons *et al.*,1990, citado por Emons *et al.*,1992).

Por outro lado Emons e colaboradores (1992) referem ainda, que em células não meristemáticas, nunca foi observado coalinhamento entre MT e MFC da parede secundária.

Com vista a procurar um relacionamento entre MT e MFC o autor e colaboradores tem desenvolvido os seus estudos desde 1980 até à actualidade utilizando células de pelos radiculares, uma vez que estes são constituídos por células com crescimento apical e com expansão em todas as direcções no ápice, mas não

apresentando expansão na parte basal e intermédia, que é em forma de tubo, devido à existência de parede celular secundária. A parede é formada por MFC depositadas em camadas helicoidais com uma variação de ângulo de deposição constante, de lamela para lamela. Essa variação do ângulo de deposição não pode advir, segundo o autor, do rearranjo das MFC durante o processo de alongamento uma vez que o referido alongamento não se verifica. Se os MT servissem de padrão à deposição das MFC, e uma vez que a sua orientação varia periodicamente, então seria de esperar uma variação de orientação semelhante por parte dos MT, o que não se verifica. Tirando partido da técnica de clivagem a seco, utilizada por Traas e Derksen, Emons e colaboradores (1992) conseguiram visualizar simultaneamente MT e MFC, observando o não alinhamento destas duas estruturas em pelos radiculares de *Equisetum*, e posteriormente confirmado em *Limnobium stoloniferum*.

Emons e colaboradores (1992) propõem:

- 1º Os MT podem servir de padrão de deposição das MFC, mas não em todas as células; o efeito dos MT sobre as MFC pode advir da proximidade dos MT da membrana impedindo a liberdade de movimento dos complexos sintetizadores de celulose e forçando-os em determinada direcção.
- 2º Os MT não servem de padrão, e neste caso pode verificar-se coalinhamento pela influência de outra força para a qual não será de descurar o papel da actina.
- 3º As MFC da parede podem forçar os MT a uma configuração determinada, vindo essa força da pressão da parede ou ainda de ligações entre MT e glicoproteínas da parede através de proteínas transmembranares intrínsecas.

Outra metodologia utilizada para esclarecer a teoria de orientação das MFC por parte dos MT foi a utilização de reguladores de crescimento vegetal (RCV).

O efeito dos RCV no padrão de orientação dos MT foi estudado em diversas plantas verificando-se que, em tecidos em crescimento citocininas, etileno e ABA (ácido abscísico), conduzem a alterações dos MT para um arranjo longitudinal, enquanto as auxinas e giberelinas, ou as duas conjugadas, induzem a uma orientação mais transversal. Efectivamente MT transversais predominam sob condições favoráveis ao alongamento celular, nomeadamente na presença de auxinas ou giberelinas (Shibaoka, 1991, citado por Shibaoka, 1994) e MT longitudinais predominam sob condições desfavoráveis ao alongamento, como sob a irradiação

da luz solar (Iwata *et al.*, 1992 citado por Shibaoka, 1994), durante os últimos estados de desenvolvimento (Lawson *et al.*, 1975, citado por Shibaoka, 1994) e ainda na presença de inibidores (Lloyd *et al.*, 1985).

Os resultados da aplicação de auxinas são complexos, diferindo entre espécies. Em coleóptilos de trigo, mesocótilos de aveia e coleóptilos de milho verifica-se alteração de MT corticais, o mesmo só ocorrendo em coleóptilos de *Vigna angularis* se os mesmos forem previamente tratados com giberelinas. Por outro lado a aplicação simultânea de auxinas e inibidores de MT não impedem o alongamento celular excepto em coleóptilos de trigo onde o alongamento é reduzido a um terço. Zandomeni e Schopfer (1993) propõem que a reorientação induzida pela auxina é independente do alongamento inicial auxina-induzido, definindo-se duas fases de acção de auxina. Numa primeira fase, de curta duração, a auxina induz o alongamento celular através do afrouxamento da parede, independentemente dos MT, e numa segunda fase, que envolve o reforço da parede, ocorre após reorientação dos MT corticais.

As giberelinas, cujo efeito no alongamento celular em caules é sobejamente conhecido, conduzem também a uma disposição mais transversal dos MTC em diversos tipos de plantas, como seja epicótilos de *Vigna angularis*, mesocótilos de milho anão, epicótilos de ervilha anã, troços de folha de cebola (Shibaoka 1994). A GA₃ leva uma a uma predominância transversal dos MT apenas quando é aplicada simultaneamente com auxina. Não se verifica alteração de movimentação dos MT quando a GA₃ é aplicada a plantas decapitadas. Em plantas inteiras onde há um fornecimento endógeno de auxina, verifica-se um efeito da GA₃ quando esta é aplicada isoladamente, o mesmo só se verificando em plantas decapitadas quando há aplicação exógena de auxina (Shibaoka, 1994).

Em epicótilos de *Vigna angularis* a GA₃ induz a reorientação dos MT para uma posição mais transversal e promove o alongamento celular, mas esse efeito não se verifica na presença de inibidores de cinases. O efeito desses inibidores não se faz sentir se a incubação com GA₃ ocorrer previamente.

O processo pelo qual a giberelina conduz ao alongamento celular ainda não está esclarecido, mas Kaneta e colaboradores (1993), propõem que haja o envolvimento de um mRNA, cuja síntese seja GA₃ induzida, pois que, trabalhando em *Vigna angularis* verificaram que, ao aplicar um inibidor da transcrição (actinomicina D) antes da aplicação de GA₃, não havia alteração do padrão de MT nem se verificava alongamento celular.

Baluska e colaboradores (1993-a), utilizando ápices radiculares de milho e inibidores de síntese de GA₃ ou mutante GA₃-deficientes, concluem que nas raízes o nível de GA₃ necessário para a expansão celular é menor que nas partes aéreas, mas que as giberelinas são substâncias inequivocamente importantes no desenvolvimento morfológico, e que controlam o padrão de apresentação dos MT, sendo o seu efeito particularmente importante na região designada post-mitótica onde se verifica um crescimento isodiamétrico. Esta região do ápice radicular, com crescimento isodiamétrico, representa uma fase de transição na ontogenia celular. Nela ocorre uma organização característica dos MTC, passando de uma distribuição dos MT menos regular, característico da divisão celular, para uma região com um padrão mais ordenado de MT, constituindo esta zona, uma região de maior sensibilidade à regulação pelas giberelinas, pois que, em plantas GA₃ deficientes, o arranjo do MTC e o padrão de formas celulares é grandemente afectado. Em face dos resultados Baluska e colaboradores (1993-a) afirmam que o efeito do ácido giberélico sobre a ordenação dos MTC se faz bastante cedo no desenvolvimento celular, sugerindo que a acção das giberelinas possa resultar de uma alteração da força de ligação MT - MT ou MT - membrana citoplasmática.

Em entrenós de aveia a aplicação de GA₃ estimula o alongamento e aumenta o nível de transcritos de tubulina, mas esse acréscimo é anulado por drogas que inibem o alongamento celular, indicando que a expressão do gene para a tubulina está estreitamente associado com o alongamento celular (Shibaoka, 1994).

Dentro das citocininas, a cinesina inibe o alongamento de caules induzido pela auxina levando ao seu engrossamento. No entanto, quando são aplicados inibidores de MT (colquicina) ou de celulose (cumarina), esse efeito é diminuído. Estes resultados confirmam o envolvimento dos MT na inibição de alongamento e que é necessária a síntese de celulose para que essa inibição se verifique (Shibaoka, 1994).

O etileno inibe a expansão longitudinal favorecendo o alongamento dos caules. O tratamento com etileno leva a uma reorientação dos MT de uma disposição transversal para uma disposição longitudinal (Lloyd, 1987; Shibaoka, 1994). Essa reorientação dos MT pelo etileno torna-se evidente 30 minutos depois do início do tratamento quando ainda não se notava uma expansão lateral etileno-induzido. A reorientação não envolve a despolimerização facto que Lloyd utiliza como apoio à teoria de uma disposição helicoidal do MT.

Também o ABA, que inibe o alongamento de caules, leva a um arranjo horizontal de MT em ervilha anã (Shibaoka, 1994).

A alteração do padrão de MT, por efeito dos RCV foi quase sempre associada à variação na taxa de alongamento, não estando esclarecido se seria a alteração dos MTC que levaram a uma alteração do alongamento ou vice-versa. Sakiyama-Sogo e Shibaoka (1993), trabalhando com ervilha anã decapitada, na qual não se verifica alteração de taxa de alongamento pela adição de ABA ou gibberelina, verificaram a ocorrência de alteração do padrão de MTC para uma disposição transversal sob o efeito de gibberelina, e uma disposição longitudinal após incubação em ABA. Embora ABA leve a uma predominância de MTC longitudinais em epicótilos de ervilha anã, na qual ABA não altera a taxa de alongamento dos epicótilos, torna-se evidente, que a reorientação dos MTC ABA-induzida, não envolve alteração da taxa de alongamento ABA-induzida, mas a predominância de MTC longitudinais pode resultar na redução ou paragem da taxa de alongamento (Sakiyama-Sogo e Shibaoka, 1993).

4.2. Banda Pré-Profásica

Na célula interfásica os MT têm uma disposição transversal, ocupando a totalidade de 4 faces da célula, mas, pouco antes da célula se dividir, eles sofrem um rearranjo concentrando-se numa banda designada Banda Pré-Profásica (BPP) (Fig 3). Esta designação advém do facto de este rearranjo ocorrer antes da prófase, podendo no entanto durar até à prófase inclusivé (Gunning *et al.*, 1985).

A BPP é a responsável pela definição do futuro plano de divisão da célula aquando da citocinese, o qual se reveste de particular importância nas células vegetais uma vez que, sendo estas estruturas mais estáticas, a morfogénese depende da direcção do alongamento e do sentido em que ocorre a divisão celular.

A BPP tem um tempo de vida curto iniciando o seu aparecimento na pré-profase e desaparecendo no final da prófase, mas na citocinese, a nova superfície criada encontra a membrana e a parede celular no local onde anteriormente se localizou a BPP (Gunning *et al.*, 1985). Utrilla e co-autores (1993), em meristemas radiculares de *Allium cepa* verificaram que a desorganização da BPP ocorria com a ruptura da membrana nuclear.

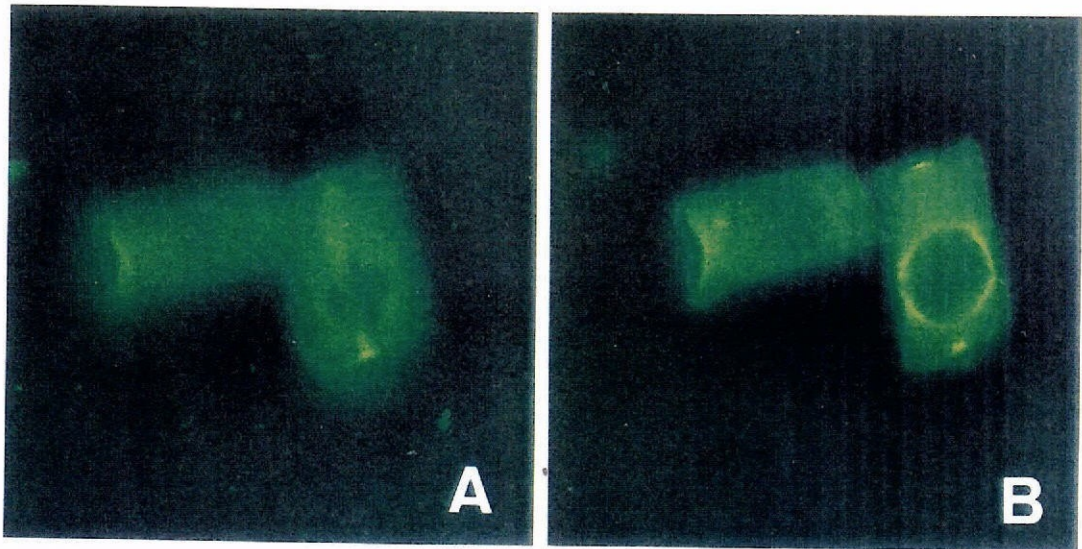


Fig. 3 - MT constituindo a Banda pré-profásica em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos anti-tubulina. **A**-BPP; **B**-Aproximação dos MT à região perinuclear formando um cesto. Ampliação 135x.

A formação da BPP inclui a migração e condensação dos MT numa banda que se vai estreitando à medida que a célula se aproxima da prófase. Segundo Lloyd e colaboradores (1985), um rearranjo ou reorientação é mais provável do que uma polimerização / despolimerização. Em 1987 os mesmos autores referem ainda que se desconhecia se a BPP era formada exclusivamente de MT já existentes, ou só novos, ou de uma mistura dos dois. De qualquer maneira, verifica-se sempre um realinhamento, uma vez que as bandas mais largas precedem as bandas mais estreitas.

No estreitamento da BPP há o envolvimento de microfilamentos de actina (Staiger *et al.*,1987), embora ainda seja desconhecido o modo como os microfilamentos circunscrevem os MT à futura zona de divisão celular (Eleftheriou e Palevitz,1992).

No período final da efémera presença da BPP, observa-se, quando se utiliza técnicas de imunofluorescência, uma aproximação da fluorescência do local da BPP para a região perinuclear. Esta disposição dos MT na região perinuclear constitui uma malha em redor do núcleo que os cientistas vulgarmente designam por cesto (fig 3B). Segundo Gunning e co-autores (1985), é possível que os MT que se encontram no citoplasma entre a BPP e a região perinuclear estivessem

ligados. Em apoio desta hipótese surge o facto de cessarem as correntes citoplasmáticas nesta região, quando a célula entra na prófase (Mineyuki *et al.*,1984, citado por Gunning *et al.*,1985).

4.3. Fuso acromático

Nos últimos estados da prófase, os MT que se dispunham casualmente junto à membrana nuclear, começam a ter um maior grau de alinhamento, com foco nas regiões do pólos do fuso acromático. Paralelamente a este aumento de MT junto ao tonoplasto, a BPP torna-se cada vez mais ténue. No final da prófase, desagrega-se a membrana nuclear e forma-se o fuso acromático, responsável pela separação dos cromossomas e seu movimento para os pólos (Fig 4).

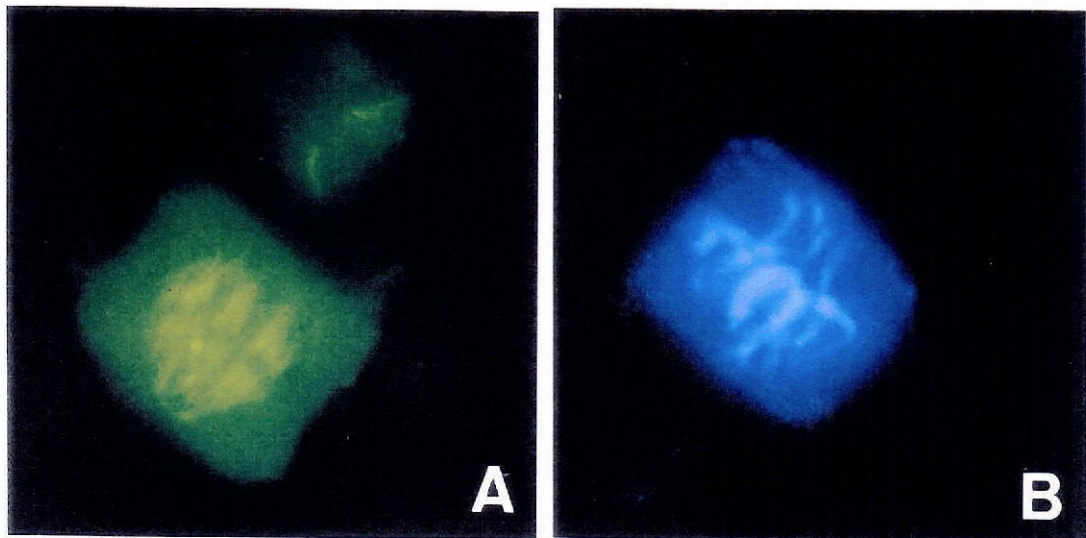


Fig. 4 - MT constituindo o fuso acromático em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos anti-tubulina. A-MT; B-cromossomas visualizados com DAPI. Ampliação 135x.

O fuso acromático, máquina proteica de grande precisão, é o responsável pela correcta segregação cromossómica, processo fundamental na manutenção das espécies.

Os MT, que constituem o fuso, organizam-se de duas maneiras: os MT polares que ligam pólo a pólo, não por cobrirem individualmente a distância total, mas por se sobrepor na zona intermédia; e os MT cinetocoriais que ligam os polos à região cinetocorial do cromossoma (Loewy *et al.*, 1991; Darnell *et al.*, 1990).

No processo mitótico, assim como na meiose, distinguem-se dois mecanismos responsáveis pela migração dos cromossomas (Darnell *et al.*, 1990; Loewy *et al.*, 1991):

- o encurtamento dos MT cinetocoriais que asseguram a migração dos cromossomas (por separação dos bivalentes) para os pólos.
- o alongamento do fuso, que compreende o distanciamento dos pólos um do outro, diminuindo concomitantemente o troço de sobreposição dos MT na zona equatorial.

Ao encurtamento dos MT cinetocoriais designa-se por anafase A, por oposição ao alongamento do fuso que envolve os MT polares que toma a designação de anafase B.

Apesar de ser totalmente desmantelado em cada ciclo celular, o fuso é muito complexo, combinando diversos tipos de movimento. Porém, o mecanismo envolvido nesse movimento ainda não está completamente esclarecido.

Burns (1988) afirma que o movimento cromossómico associado ao encurtamento dos MT cinetocoriais, e, portanto, em direcção à extremidade (-), não requer a presença de GTP ou ATP, levantando a hipótese da energia resultar de uma mudança conformacional da dissociação das subunidades de tubulina, ou ainda da difusão do cinetocoro ao longo dos MT. Esta hipótese é apoiada pelo facto de agentes que provocam a despolimerização dos MT induzirem ou acelerarem a migração dos cromossomas *in vivo* (Koshland *et al.*, 1988). Por outro lado o movimento correspondente a anafase B parece ser ATP dependente, pois que a presença de ATP, leva ao decréscimo da zona de sobreposição dos MT (Hollenbeck, 1985).

A diminuição da zona de sobreposição parece envolver o deslizar dos MT uns sobre os outros diferindo do movimento flagelar pelo facto dos MT se encontrarem com polaridade opostas (Loewy *et al.*,1991; Burns,1988). Embora Burns em 1988 refira que não tinha sido ainda encontrada nenhuma proteína com actividade motora neste sistema, Gelfand e colaboradores (1992), citando Sawin e co-autores (1992), referem que, em células animais (ovos de *Xenopus*) foi identificada uma proteína relacionada com a cinesína (Eg5) que funciona como motor na extremidade (-) dos MT. Esta proteína concentra-se junto ao pólo do fuso contribuindo para a sua organização e fluxo de tubulina. Paralelamente referem também outras proteínas relacionadas com a cinesina, nomeadamente MKLP1 (citando o trabalho de Nislow *et al.*,1992 em células animais em cultura), capazes de dirigir o movimento antiparalelo dos MT, movimento esse semelhante ao que se verifica na anafase B.

4.4. Fragma-plasto

O fragma-plasto é constituído por duas faixas de MT de grande densidade e pequeno comprimento justapostas no plano equatorial do anterior fuso. Esta dupla superfície expande-se centrifugamente até atingir a membrana celular onde na profase se localizou a BPP (Gunning *et al.*,1985) (Fig 5).

O local de nucleação do fragma-plasto parece residir na região perinuclear dos núcleos recém formados, tendo a sua extremidade (-) voltada para o núcleo e a extremidade (+) voltada para a nova superfície de membrana (Lloyd, 1987).

Utilizando *Tradescantia* Gunning e colaboradores (1985) verificaram que microferidas feitas na zona da BPP, durante a anafase ou no meio da citocinese, provocam anomalias na formação do fragma-plasto, tendo este um desenvolvimento normal em todas direcções excepto em direcção à membrana onde se realizou a microferida. Os autores sugerem que possam existir interacções entre a margem no local da BPP e o fragma-plasto, interacções essas que poderiam ter sido quebradas quando se realizou a microferida.

Os MT que o constituem servem de guia para a deposição de vesículas do complexo de Golgi com material de parede e de membrana para a constituição da nova superfície de separação das células recém formadas. Pensa-se, também, que neste processo estarão envolvidas proteínas com actividade motora capazes de movimentar as vesículas ao longo dos MT, mas apesar de Yasuhara e colaboradores (1992) em células de tabaco em cultura terem conseguido isolar polipépti-

dos a partir de fragmoplastos isolados, esses polipéptidos não foram correlacionados com proteínas da família da cinesina nem apresentavam actividade ATPase.

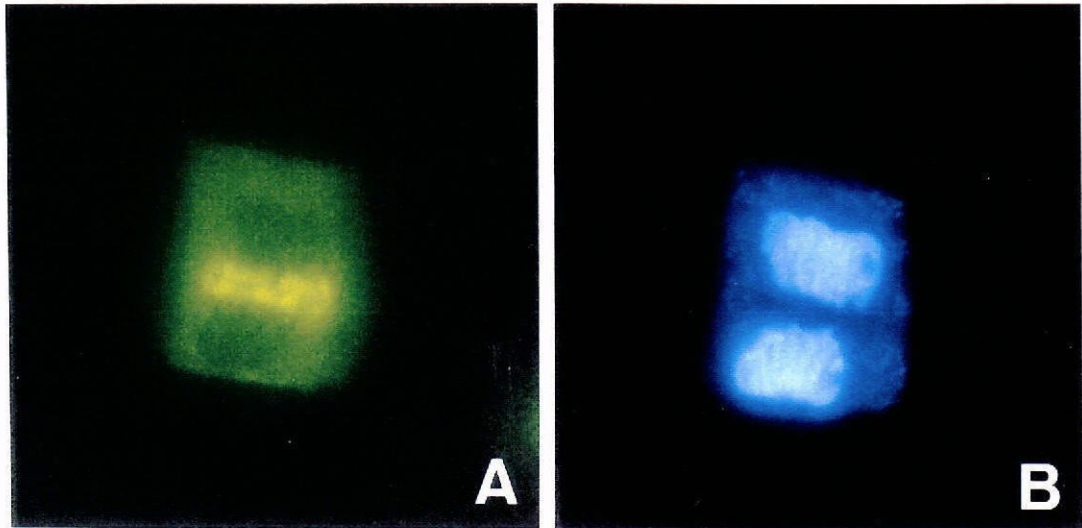


Fig. 5 - MT constituindo o fragmoplasto em células de ápices radiculares de centeio visualizados por imunofluorescência com anticorpos antitubulina. **A**-MT; **B**-cromossomas visualizados com DAPI. Ampliação 135x.

5. Material e métodos

5.1. Material vegetal

Gentilmente cedidas pela UTAD (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro) dispusemos, para a realização deste trabalho de 11 variedades e populações de centeio (*Secale cereale* L.) de diversas proveniências. As populações Lordelo e Padrela oriundas de Portugal, as variedades Dank nowe e Warko da Polónia, e as restantes variedades Amando, Gambit, Hacada, Halo, Marder, Peras e Rapid da Alemanha.

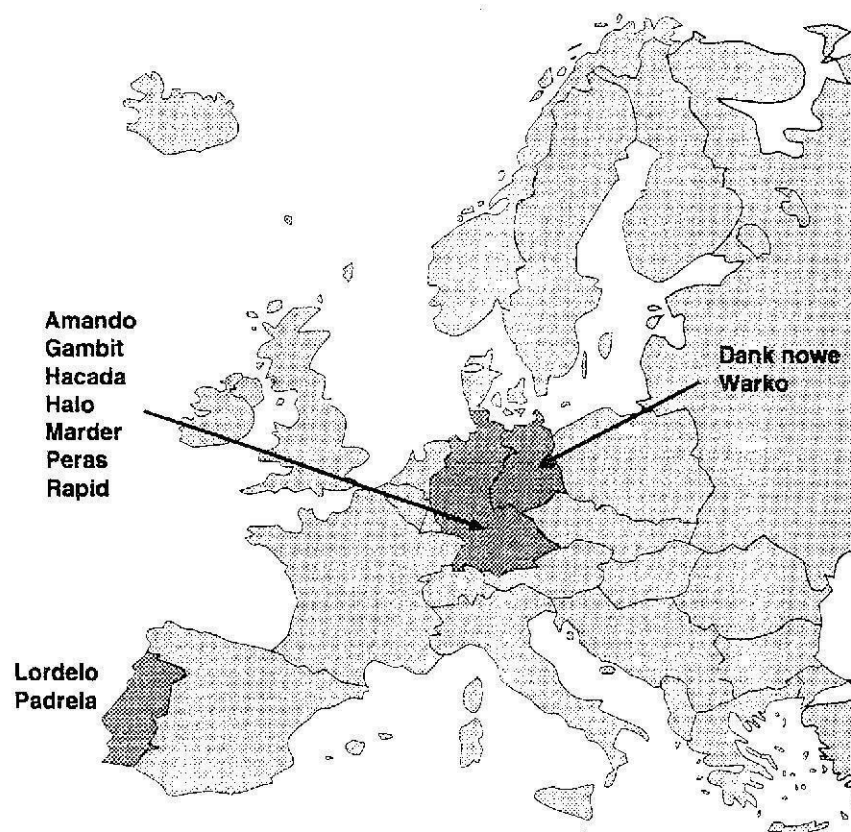


Fig. 6 - Origem das variedades e populações de centeio.

5.2. Curvas de crescimento

Para a seriação das variedades de que dispunhamos procedeu-se à realização das curvas de crescimento radicular. Foram incubadas 10 sementes por variedade, em placas de Petri com o fundo forrado de algodão e papel de filtro embebido em água destilada, a 4°C e 8°C. O comprimento das raízes foi medido em milímetros (mm), de dois em dois dias. O valor utilizado nos gráficos das curvas de crescimento resulta assim do comprimento radicular médio de 10 sementes.

As variedades / populações mais interessantes seriam aquelas que apresentassem maior discrepância entre a curva de crescimento a 4°C e 8°C, ou seja aquelas cuja variação de temperatura provocasse maiores diferenças comportamentais. As curvas de crescimento, por si só, não nos facilitavam essa tarefa. Utilizando um programa em XLISP (Anexo I), procurou-se encontrar a função de crescimento que melhor se ajustava às curvas de crescimento. A função foi do tipo exponencial $y=ax^n$.

A obtenção das funções de crescimento permitiu a utilização de uma estatística do tipo T para avaliar se havia ou não diferenças significativas entre os parâmetros n da função a 4°C e 8°C, ou seja permitiu testar:

$$\begin{aligned} H_0: \beta_4^0 - \beta_8^0 &= 0 \\ \text{vs} \\ H_1: \beta_4^0 - \beta_8^0 &\neq 0 \end{aligned}$$

com β_4^0 - como estimador de n na função de crescimento a 4°C e com β_8^0 como estimador de n na função de crescimento a 8°C,

$$\text{sabendo que: } \frac{(\beta_4^0 - \beta_8^0) - (\beta_4^0 - \beta_8^0) H_0}{\sqrt{2Sp^2}} \sim T_{a+b}$$

$$\text{com } Sp^2 = \frac{a \text{vâr}(\beta_4^0) + b \text{vâr}(\beta_8^0)}{a+b}$$

$$\text{e } a = gl(SQRE_4^0), \quad b = gl(SQRE_8^0).$$

Obtidas as funções de crescimento e utilizando a estatística atrás citada tornou-se possível avaliar quais as variedades mais interessantes, para atingir o

objectivo proposto, prosseguindo com essas variedades para avaliação do padrão de microtúbulos nas células de ápices radiculares.

5.3. Metodologia para a observação do padrão de microtúbulos

Para observação do padrão de microtúbulos as sementes de cada variedade foram colocadas em placas de Petri igualmente forradas e embebidas em água destilada e incubadas a 20°C. Quando as sementes apresentavam um comprimento radicular da radícula principal de um a dois centímetros (geralmente dois ou três dias), foram retirados ápices para fixação correspondente, portanto, à modalidade testemunha (20°C), e as restantes sementes eram distribuídas equitativamente nas modalidades de 4°C e 8°C. Destas duas temperaturas de incubação foram retirados ápices para fixação após 1, 4 e 24 horas de incubação.

5.3.1. Técnica de fixação e marcação

A técnica utilizada foi a descrita por Clayton e Lloyd (1984) e que passamos a descrever.

Fixação Utilizou-se uma solução de 4% de formaldeído em 50 mM de PIPES [piperazina-N,N'-bis(ácido dietanosulfónico)], 5 mM MgSO₄ (sulfato de magnésio hepta-hidratado), 5 mM EGTA [etilenoglicol-bis(β-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetracético], pH 6,9 (MTSB), durante 45 minutos, seguindo-se 3 lavagens com MTSB de 15 minutos cada.

Digestão da parede celular Utilizou-se uma solução de 2% de celulase (Onozuka R10) em MTSB durante 6 minutos seguida de 3 lavagens de 15 minutos com MTSB.

Esfregaco Colocaram-se os ápices radiculares numa lâmina para imunofluorescência e, com o auxílio de uma lupa de luz inferior, retirou-se a coifa aproveitando-se apenas o primeiro milímetro da raiz e com um

bisturi procurando-se obter células individualizadas. Após secagem ao ar seguiu-se a marcação.

Marcação Utilizaram-se os seguintes anticorpos:

Anticorpo primário: Anticorpo monoclonal de rato para a tubulina isolada a partir de levedura. Este tipo de anticorpo é uma imunoglobulina do tipo IgG2a, extraída do líquido ascítico, produzida pelo clone YOL 1/34, e comercializado pela empresa Serotec. Este anticorpo será designado por anti-tubulina.

Anticorpo secundário: Anticorpo produzido em ovelha que reconhece as imunoglobulinas do tipo Ig G, A e M de rato. Este anticorpo, comercializado também pela Serotec, está conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Em cada esfregaço utilizou-se 10µl de anticorpo primário numa diluição de 1/50 em MTSB durante 45 minutos, seguido de 3 lavagens de 15 minutos com MTSB. Seguiu-se a aplicação do anticorpo secundário na diluição de 1/100 em MTSB durante 45 minutos, após os quais se realizaram 3 lavagens cada com MTSB com a duração de 20 minutos cada.

Para a marcação da cromatina utilizou-se DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) na concentração de 1µg/ml em água destilada, durante 1 minuto. Seguiu-se uma lavagem com MTSB.

Montagem Na montagem adicionou-se, a cada janela, um produto que retarda a perda de sinal, comercializado pela Universidade de Londres sob a designação de citifluor, em que a substância activa é diluída em glicerol e solução fosfato salino. Colocou-se a lamela e selou-se com verniz.

Silanização das lâminas

Antes de serem utilizadas para a realização do esfregaço as lâminas sofreram um processo de silanização que permite uma maior aderência das células às lâminas.

Após duas a quatro horas de imersão em mistura sulfo-crômica, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas em estufa. Quando as lâminas estavam secas foram mergulhadas em 2% de 3-aminopropil-trimetoxi-silano durante 30 segundos seguindo-se duas passagens por acetona e secagem em estufa.

Microscópio

As observações realizaram-se no ISA, utilizando o microscópio de epifluorescência, Leitz Biomed, equipado com uma câmara fotográfica Wild MPS 52.

5.3.2. Padrão de Microtúbulos

Para avaliação do padrão de microtúbulos definiram-se cinco tipos principais de possíveis apresentações dos MT, sendo as células observadas classificadas do seguinte modo:

MO - (Fig 7A) - Células que apresentavam muitos microtúbulos e organizados;

PO - (Fig 7B) - Células que apesar de apresentarem o padrão cortical característico apresentavam poucos microtúbulos;

MD - (Fig 7C) - Células que apresentavam muitos microtúbulos mas de pequeno comprimento e dispostos de uma maneira mais casual, mais desorganizada;

PD - (Fig 7D) - Células que apresentavam poucos microtúbulos e desorganizados;

S - Células sem microtúbulos.

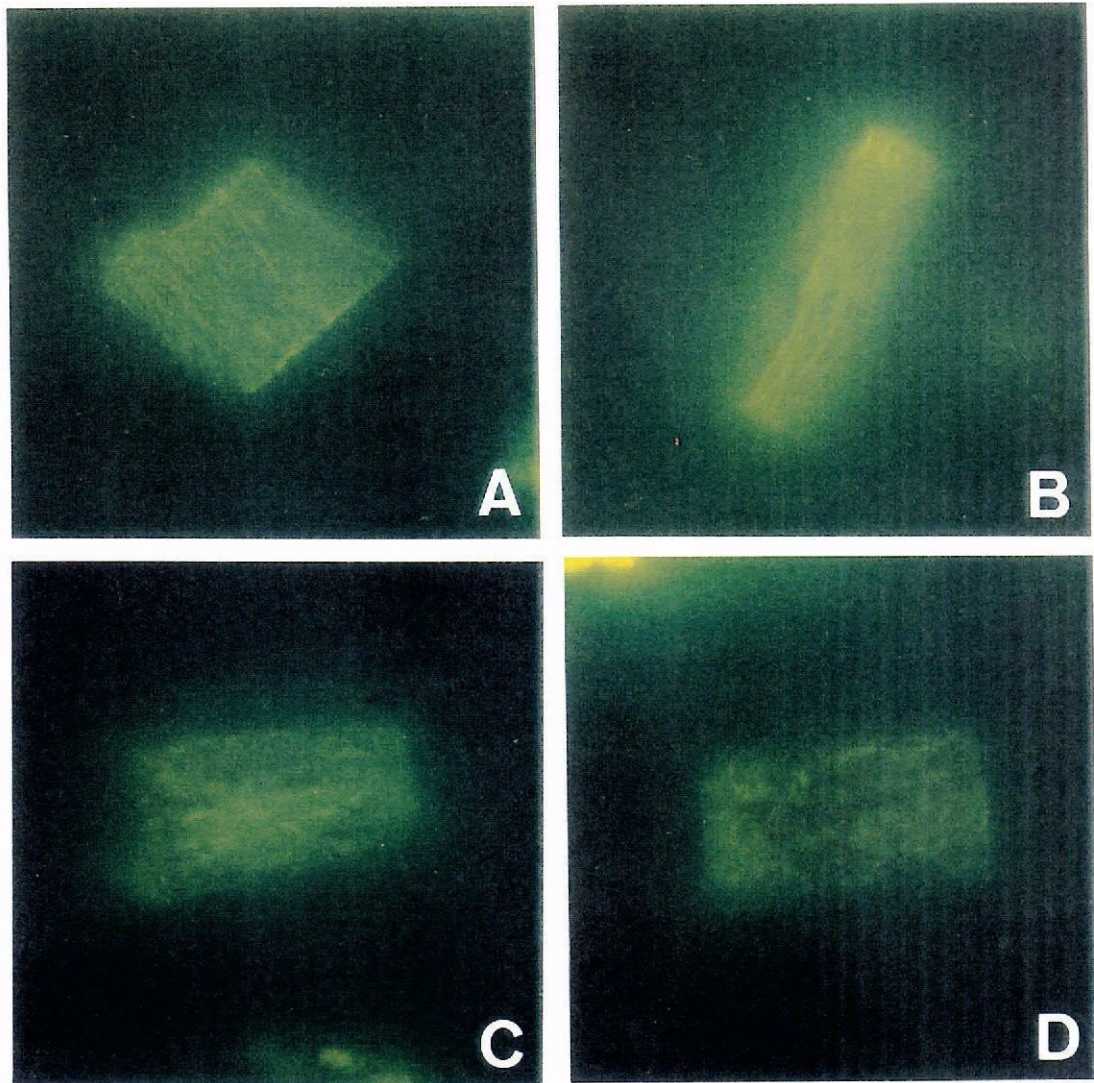


Fig. 7 - Visualização de MT em células de ápices radiculares de centeiopor imunofluorescência com anticorpos antitubulina. **A**-Padrão MO (Muitos e Organizados); **B**-Padrão PO (Poucos mas Organizados); **C**-Padrão MD (Muitos mas desorganizados); **D**-Padrão PD (Poucos e desorganizados).

As células a observar deviam respeitar os seguintes parâmetros:

- i) Estarem em interfase. Deste modo só eram avaliados os microtúbulos corticais.
- ii) Estarem individualizadas, ou seja não estarem justapostas a qualquer outra célula;
- iii) Estarem completas;

iv) Não se apresentarem de topo, dado que nesta disposição não pode ser avaliada a organização dos microtúbulos corticais.

v) Não estarem nos bordos da preparação pois pode, devido a uma pior silanização das lâminas, o anticorpo "fugir" para o centro da preparação.

Na modalidade a 20°C foram realizadas três repetições, com observação de 50 células em cada repetição num total de 150 células.

Na modalidade a 8°C foi realizada apenas uma repetição por cada período de incubação, resultando um total de 150 células por variedade / população na globalidade da modalidade a 8°C.

A 4°C foram realizadas três repetições por cada tempo de incubação (150 células) num total de 450 células para cada variedade / população na globalidade da modalidade.

Para avaliar o padrão de MT segundo os critérios atrás definidos e uma vez que as lâminas de que dispunhamos eram de três janelas foram usualmente distribuídas as diferentes modalidades do seguinte modo: a primeira janela tinha sempre o esfregaço correspondente à modalidade de 20°C, e, nas duas seguintes, duas temperaturas diferentes para o mesmo tempo de incubação. Portanto a primeira modalidade a observar era sempre, em cada lâmina, a modalidade de 20°C, tentando, em cada sessão de observações, uma aferição do avaliador.

5.4. Metodologia estatística

A homogeneidade de comportamento intravarietal e intervarietal foi avaliada através da estatística do χ^2 uma vez que tínhamos observações que se distribuíam por diferentes classes. Na modalidade a 20°C, as classes PO, MD e PD tiveram de ser agrupadas, pois esta estatística indica que cada classe não deve apresentar valores inferiores a cinco (Carvalho, 1988; Parker, 1973).

A hipótese de homogeneidade era rejeitada sempre que o valor de χ^2 correspondesse a uma probabilidade inferior a 5% ($\alpha=0.05$).

6. Resultados

6.1. Curvas de crescimento

Das medições efectuadas construíram-se as curvas de crescimento radicular a 4°C e 8°C para cada uma das variedades / populações (Anexo I).

Pela análise das curvas de crescimento verificamos, como seria de esperar, que havia variedades / populações com maior ou menor desenvolvimento no mesmo período de tempo e sob as mesmas condições. As variedades Marder e Peras tiveram um crescimento muito inferior às restantes apresentando também uma baixa taxa de germinação (dados não incluídos), pelo que foram retiradas das observações seguintes. As variedades Rapid e Dank nowe foram as que mais se desenvolveram a 8°C, enquanto a 4°C são as populações Lordelo e Padrela as que atingem maior crescimento.

O cálculo das funções de crescimento a 4°C e 8°C (Anexo I) permitiu com a utilização da estatística exposta em material e métodos (pág. 23) distinguir as variedades / populações com diferenças significativas entre as duas curvas de crescimento (a 4° e a 8°C)(Quadro 1).

Quadro 1 - Valores da estatística para comparação das curvas de crescimento a 4°C e 8°C.

Variedade / população	Diferença significativa	Diferença não significativa
Amando	t=5,671	
Dank nowe	t=2,531	
Gambit		t=1,753
Hacada	t=2,642	
Halo		t=0,110
Lordelo		t=1,785
Padrela	t=5,053	
Rapid	t=2,999	
Warko		t=1,784

$$t_{8(0,05)}=1,860$$

As variedades Amando, Dank nowe, Hacada e Rapid bem como a população Padrela apresentam diferenças significativas entre as curvas de crescimento a 4°C e 8°C, enquanto que para Gambit, Halo, Lordelo e Warko não se verifica um efeito significativo da variação da temperatura no crescimento radicular.

6.2. Padrão de organização dos microtúbulos corticais

6.2.1. Modalidade de 20°C

No quadro 2 encontram-se os resultados da observação do padrão de MT após incubação a 20°C.

Quadro 2 - Número de células nos diferentes padrões de organização que cada variedade / população apresentou na modalidade de 20°C.

	20 °C											
	1ª Rep				2ª Rep				3ª Rep			
	MO	PO	MD	PD	MO	PO	MD	PD	MO	PO	MD	PD
Amando	36	9	5	0	42	5	3	0	41	4	5	0
Dank nowe	43	6	1	0	41	6	3	0	40	6	4	0
Gambit	42	1	7	0	44	1	5	0	44	3	3	0
Hacada	41	7	2	0	45	4	1	0	46	2	2	0
Halo	46	1	3	0	44	0	6	0	42	3	5	0
Lordelo	44	5	1	0	44	3	3	0	41	6	2	0
Padrela	40	6	4	0	42	3	5	0	41	5	4	0
Rapid	42	2	5	1	41	4	4	1	43	6	1	0
Warko	37	8	5	0	36	4	7	3	44	2	4	0

(MO-Muitos e organizados; PO-Poucos e organizados; MD-Muitos e desorganizados; PD-Poucos e desorganizados)

Os valores de χ^2 para análise de homogeneidade intravarietal podem ser consultados no Quadro 3.

Quadro 3 - Valores de χ^2 na avaliação de homogeneidade intravarietal na modalidade 20°C.

	20 °C	
	χ^2	Proby χ^2 (%)
Amando	2,521	28,35
Dank nowe	0,651	72,20
Gambit	0,461	79,39
Hacada	2,651	26,56
Haio	1,515	46,88
Lordelo	0,462	79,39
Padrela	0,271	87,33
Rapid	0,297	86,17
Warko	4,429	10,92

No Quadro 4 encontra-se o valor de χ^2 resultante da comparação inter-varietal na modalidade a 20°C (Anexo III).

Quadro 4 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade de ocorrência para análise de homogeneidade intervarietal a 20°C.

modalidade	total	
	χ^2	Probab. (%)
20 °C	22.618	12

6.2.2. Modalidade de 8°C

Quando incubadas a 8°C verificou-se uma diminuição do número de células com padrão MO com um aumento correspondente dos outros padrões (Quadro 5), ou seja ocorre uma certa despolimerização dos MT.

No Quadro 6 podem ser consultados os valores de χ^2 para análise de homogeneidade entre os diferentes tempos de incubação a 8°C. Ele permite-nos verificar que há homogeneidade de comportamento dentro de cada variedade / população, independentemente do tempo de incubação - 8°C-1h, 8°C-4h e 8°C-24h.

Quadro 5 - Número de células nos diferentes padrões de organização que cada variedade / população apresentou na modalidade de 8°C.

	8°C											
	1 hora				4 horas				24 horas			
	MO	PO	MD	PD	MO	PO	MD	PD	MO	PO	MD	PD
Dank nowe	36	12	2	0	44	2	4	0	37	9	4	0
Gambit	35	8	2	5	37	4	9	0	41	3	6	0
Lordelo	38	8	4	0	38	7	2	3	34	6	10	0
Padrela	36	8	3	3	33	8	8	1	41	5	4	0
Rapid	37	7	4	2	36	6	6	2	36	10	4	0

(MO-Muitos e organizados; PO-Poucos e organizados; MD-Muitos e desorganizados; PD-Poucos e desorganizados)

Quadro 6 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade na modalidade 8°C

modalidade	Dank nowe		Gambit		Lordelo		Padrela		Rapid	
	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)
8°C(1h,4h,24h)	4,429	10,9	2,009	36,6	1,091	57,9	3,341	18,8	0,067	96,7

Pela análise dos valores do Quadro 7 podemos verificar que as diferentes variedades / populações têm comportamentos semelhantes nos tempos de tratamento a 8°C.

Quadro 7 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade de ocorrência para análise de homogeneidade intervarietal a 8°C.

modalidade	total		1 hora		4 horas		24 horas	
	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)
8 °C	11.724	92.5	0.525	97.1	6.992	13.6	4.207	37.9

6.2.3. Modalidade de 4°C

A incubação a 4°C, sendo uma temperatura mais baixa e por conseguinte mais desfavorável, levou a maior despolimerização dos MT, verificando-se de uma maneira geral um maior número de células nos padrões PO, MD e PD, e um decréscimo do número de células no padrão MO (Quadro 8).

Quadro 8 - Número de células nos diferentes padrões de organização que cada variedade / população apresentou na modalidade de 4°C.

	Rep	4 °C											
		1 hora				4 horas				24 horas			
		MO	PO	MD	PO	MO	PO	MD	PO	MO	PO	MD	PO
Dank nowe	1	35	11	1	3	32	5	11	2	31	12	6	1
	2	28	13	8	1	29	15	4	2	34	8	6	2
	3	27	12	7	4	30	10	8	2	32	9	8	1
	Total	90	36	16	8	91	30	23	6	97	29	20	4
Gambit	1	37	6	3	4	37	6	6	1	44	1	5	0
	2	30	7	7	6	32	4	8	6	38	5	4	3
	3	25	12	9	4	30	11	7	2	35	7	6	2
	Total	92	25	19	14	99	21	21	9	117	13	15	5
Lordelo	1	40	4	6	0	33	10	6	1	33	10	6	1
	2	30	9	5	6	27	9	11	3	34	10	5	1
	3	29	9	6	6	30	10	9	1	34	8	7	1
	Total	99	22	17	12	90	29	26	5	101	28	18	3
Padrela	1	35	9	6	0	37	6	7	0	40	9	1	0
	2	31	9	6	4	28	7	12	3	35	9	6	0
	3	33	6	5	6	32	10	8	0	37	8	4	1
	Total	99	24	17	10	97	23	27	3	112	26	11	1
Rapid	1	29	9	9	3	33	6	10	1	34	6	8	2
	2	28	10	11	1	28	9	10	3	27	10	11	2
	3	26	14	7	3	27	13	10	0	26	12	8	4
	Total	83	33	27	7	88	28	30	4	87	28	27	8

(MO-Muitos e organizados; PO-Poucos e organizados; MD-Muitos e desorganizados; PD-Poucos e desorganizados)

O teste de χ^2 não nos permite rejeitar a hipótese de homogeneidade intra-varietal no seio de cada tempo de incubação a 4°C para cada variedade / população (Quadro 9).

A aplicação do mesmo teste na comparação entre os vários tempos de incubação a 4°C permite-nos verificar que tanto a variedade Gambit como a população Padrela apresentam comportamento diferente entre os diferentes tempos de incubação, uma vez que a probabilidade correspondente ao valor de χ^2 é de 3.4% para Gambit e 4.8% para Padrela. As variedades Dank nowe e Rapid bem como a população Lordelo não têm um comportamento significativamente diferente nos diferentes tempos de incubação a 4°C. Para as variedades Dank nowe e Rapid e população Lordelo não se verifica um efeito da duração do tratamento.

Quadro 9 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade na modalidade de 4°C.

modalidade 4°C	Dank nowe		Gambit		Lordelo		Padrela		Rapid	
	χ^2	Probab. b.(%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)
1 horas	4,68	32,14	7,03	13,42	6,65	15,54	2,55	63,61	1,68	79,49
4 horas	7,71	10,30	7,10	13,06	3,06	54,85	6,19	18,55	3,76	43,96
24 horas	1,29	86,29	6,08	19,29	0,59	96,40	3,92	41,75	3,71	44,66
1-4-24 horas	1,86	76,08	10,39	3,44	3,87	42,35	9,57	4,83	0,74	94,58

A análise de homogeneidade intravarietal na modalidade de 4°C pode ser realizada com base nos valores do Quadro 10, mostra significativas diferenças entre as variedades /populações no final de 24 horas de frio.

Quadro 10 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade de ocorrência para análise de homogeneidade intervarietal a 4°C.

modalidade	total		1 hora		4 horas		24 horas	
	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)	χ^2	Probab. (%)
4 °C	46.41	11.46	16.961	15.11	4.292	82.98	25.16	0.15

A contribuição de cada variedade para o elevado valor de χ^2 que se regista na modalidade de 4°C-24h pode ser consultada no Quadro 11.

Quadro 11- Contribuição de cada variedade / população para o valor de χ^2 da modalidade 4°C-24horas.

	4°C-24 h				g.l	χ^2	Prob. χ^2 (%)
	MO	PO	MD+PD				
Dank nowe	97	29	24	150	2	1,1528	
Gambit	117	13	20	150	2	7,8331	
Lordelo	101	28	21	150	2	0,5319	
Padreia	112	26	12	150	2	5,7100	
Rapid	87	28	35	150	2	9,9288	
Total	514	124	112	750	8	25,1566	0.15
esperados	102,8	24,8	22,4	150			

6.2.4. Modalidade 20°C versus 8°C e 4°C.

A comparação das modalidades correspondentes às diferentes temperaturas mostra que em todas as variedades / populações há um efeito da temperatura na polimerização dos MT (Quadro 13).

Quadro 13 - Valores de χ^2 e respectiva probabilidade na comparação entre as diferentes temperaturas de incubação.

modalidade	Dank nowe		Gambit		Lordelo		Padreia		Rapid	
	χ^2	Prob. (%)	χ^2	Prob. (%)	χ^2	Prob. (%)	χ^2	Prob. (%)	χ^2	Prob. (%)
20°C-8°C-4°C	32.462	1E-04			29.109	7E-04			5E04	3E-06
20°C-8°C-4°C,1h			26.878	2E-03			10.303	3.56		
20°C-8°C-4°C,4h			18.833	0.08			12.576	1.35		
20°C-8°C-4°C,24h			7.776	10.01			6.380	17.25		

7. Discussão

A análise dos resultados apresentados permite-nos dizer que a 20°C não há diferenças significativas no grau de organização dos MTC entre plantas da mesma variedade / população e mesmo entre plantas variedades / populações diferentes.

Resultados semelhantes ocorrem na modalidade a 8°C uma vez que não se registam diferenças significativas de comportamento entre os diferentes tempos de incubação, ou seja, não se verifica um efeito do tempo no tratamento a 8°C. Este facto permitiu o agrupamento dos dados e o seu tratamento como um todo na comparação com as modalidades de 20°C e de 4°C.

Nas modalidades de 20°C e de 8°C verifica-se homogeneidade de comportamento intravarietal.

Na modalidade a 4°C verifica-se homogeneidade de comportamento no seio de cada variedade e período de incubação, mas essa homogeneidade não se verifica quando comparamos os diferentes períodos de incubação de Gambit e Padrela.

A análise de homogeneidade intervarietal a 4°C permite-nos observar que, embora na globalidade da modalidade a 4°C as variedades / populações possam ser consideradas homogêneas, pois a probabilidade correspondente ao valor de χ^2 é de 11.46%, quando analisamos o seu comportamento relativamente a cada período de incubação a 4°C, verificamos que não se comportam de modo semelhante no final de 24 horas a 4°C (probabilidade correspondente a χ^2 de 0.15%). Da análise da contribuição de cada variedade / população para o elevado valor desse χ^2 (Quadro 10) observa-se que são sobretudo as variedades Gambit e Rapid e população Padrela as que mais contribuem para esse elevado valor, tendo, no conjunto das cinco, comportamentos extremos.

De notar que sendo o centeio uma espécie de fecundação cruzada não apresenta diferenças significativas na resposta ao tratamento entre plantas da mesma variedade / população. Isso permite-nos comparar variedades diferentes e garante-nos também, que as diferenças observadas nessas comparações não são devidas a variações introduzidas pela técnica.

No final de 24 horas a 4°C a variedade Rapid apresenta, relativamente às outras variedades / populações, uma maior despolimerização dos MTC (menor número de células com padrão MO, e simultaneamente, o maior número de células com padrão PD).

A variedade Gambit é aquela que apresenta uma maior percentagem de células no padrão MO seguida da população Padrela. Esta última é a que apresenta o menor número de células no padrão PD.

No conjunto podemos dizer que Rapid e Dank nowe têm um comportamento semelhante entre si, e distinto de Gambit e Padrela, que, entre si, também apresentam alguma semelhança (Fig. 8).

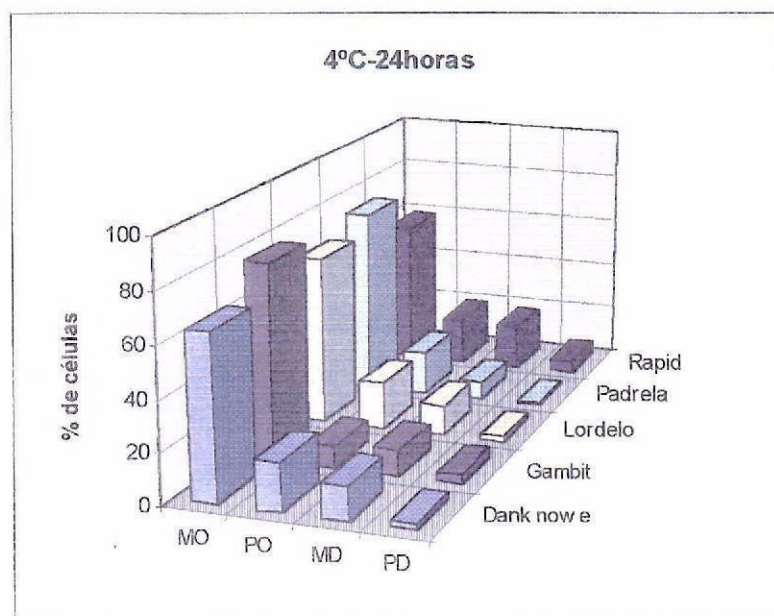


Fig. 8- Percentagem de células nos diferentes padrões de organização na modalidade 4°C-24h. Esquema comparativo entre variedades/populações.

As variedades Rapid e Dank nowe sob o efeito do frio despolimerizam bastante os seus MT que se mantêm despolimerizados no final das 24 horas de frio, enquanto Gambit e Padrela também sofrem uma despolimerização inicial após 1 hora e 4 horas de frio mas no final de 24 horas já apresentam alguma recuperação. Essa recuperação é tão significativa que o valor de χ^2 nos permite dizer que é semelhante a 8°C e 20°C (Quadro 10; Anexo III.5).

A diferença de comportamento, em termos de crescimento radicular, das variedades / populações numa temperatura stressante parece estar correlacionada com o grau de polimerização dos MTC.

Ao analisarmos comparativamente as curvas de crescimento e o grau de polimerização dos MTC (fig. 9 e 10) podemos dizer o seguinte:

A variedade *Gambit*, que às 24 horas de frio já recuperou bastante da sua despolimerização inicial, não apresenta diferença significativa entre a curva de crescimento radicular a 4°C *versus* 8°C, sendo o valor do estimador de *n* um valor muito semelhante nas duas curvas (Anexo I), o que é o mesmo que dizer que apenas se verifica um desfaseamento no tempo entre as duas curvas.

A população *Padrela*, cujo comportamento dos MT é semelhante à variedade *Gambit*, com forte recuperação da polimerização às 24 horas de frio, apesar de apresentar diferença significativa entre as curvas de crescimento radicular a 4°C e 8°C é a que atinge maior crescimento a 4°C.

A variedade *Rapid* apresenta uma diferença significativa entre as curvas a 4°C e 8°C, sendo a variedade que, logo a seguir a *Dank nowe* atinge maior crescimento a 8°C, ocorrendo uma quebra bastante acentuada no crescimento a 4°C relativamente a 8°C. No que respeita ao grau de polimerização dos MT, a análise da figura 7, permite-nos dizer que se verifica uma despolimerização inicial a 4°C-1 hora não ocorrendo a recuperação que se observou nas variedades *Padrela* e *Gambit*.

A variedade *Dank nowe*, sendo a variedade que atinge maior crescimento a 8°C, tem um comportamento muito semelhante ao da variedade *Rapid*, não só no que respeita ao crescimento radicular, em que ocorre uma diferença significativa entre as curvas a 4°C e 8°C, como também na organização dos MT em que se verifica uma descida muito ligeira na percentagem de células com padrão PD, mas continuando a ocorrer uma elevada percentagem de células com padrão PO+MD+PD.

A população *Lordelo* tem curva de crescimento radicular semelhante a *Padrela* sendo a que, depois de *Padrela*, atinge maior crescimento a 4°C, não se verificando, no entanto diferença significativa entre a curva a 4°C e 8°C. O comportamento dos MT pode-se dizer que está numa situação intermédia entre *Gambit* e *Padrela versus Dank nowe* e *Rapid*, aproximando-se mais das primeiras do que das segundas.

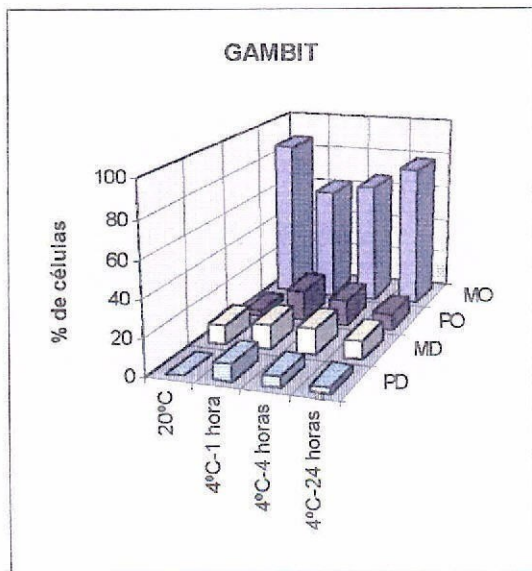
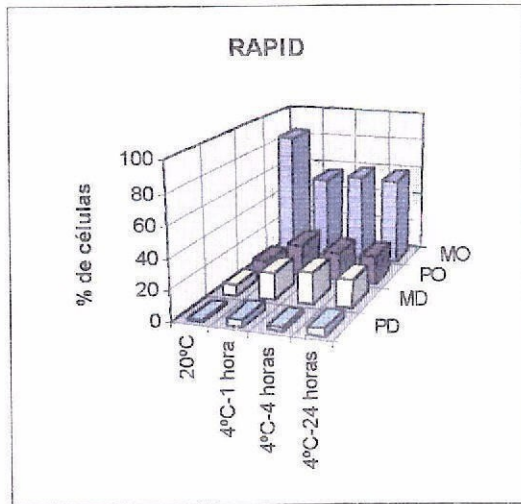
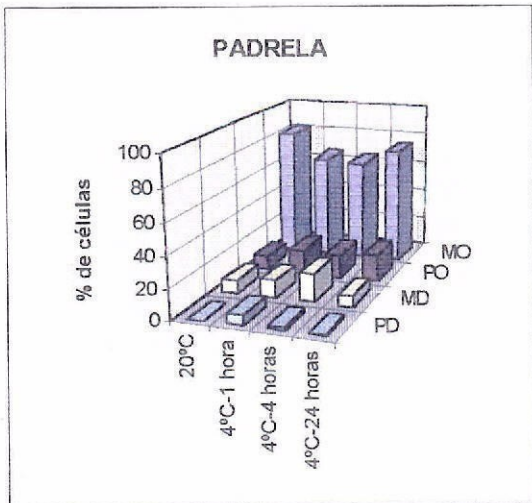
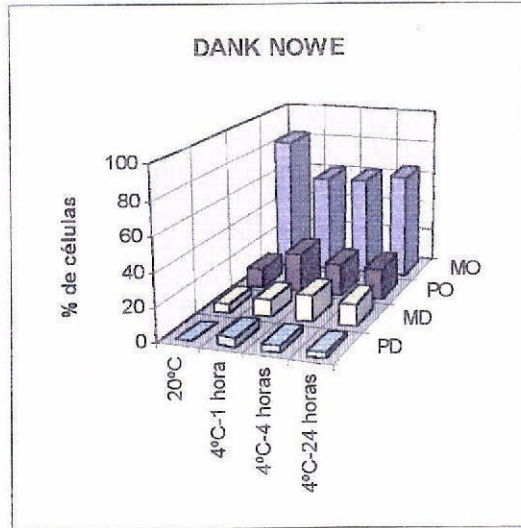
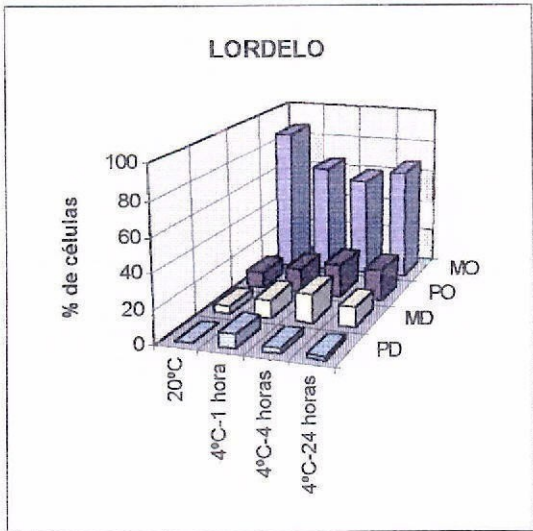


Fig. 9 - Percentagem de células nos diferentes padrões de organização dos MTC na modalidade 20°C e 4°C (1hora; 4horas; 24horas).

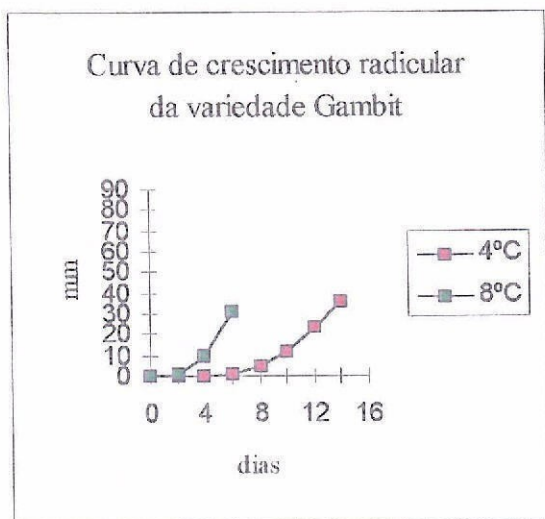
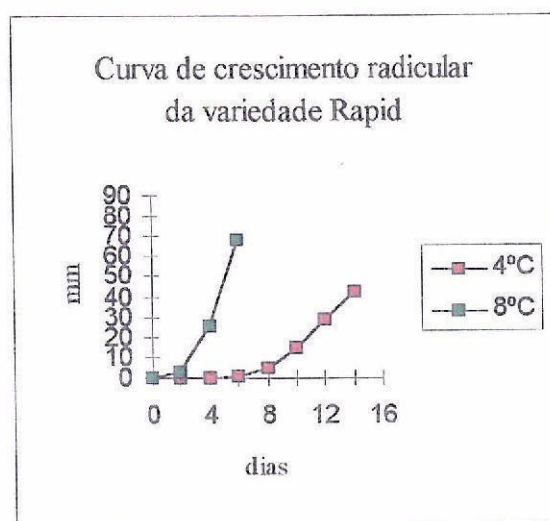
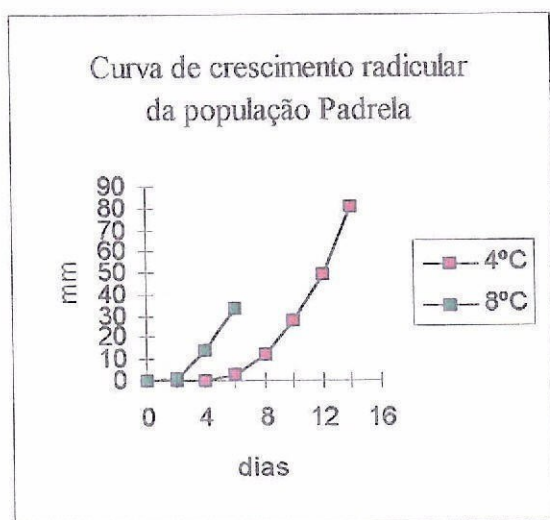
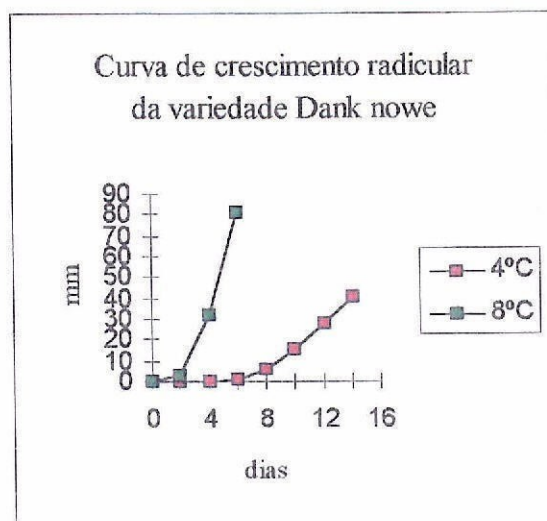
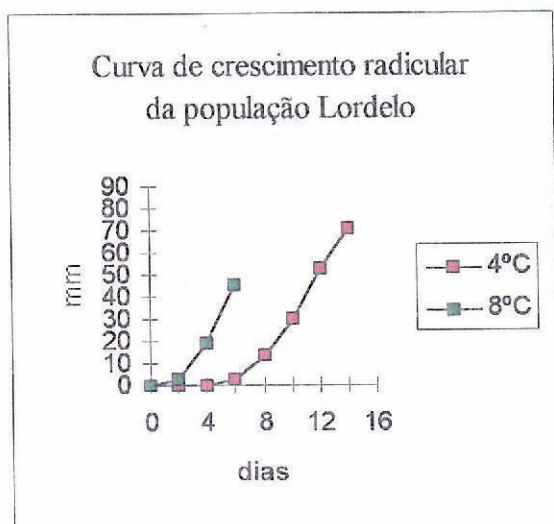


Fig. 10 - Curvas de crescimento radicular das variedades/populações Dank nowe, Gambit, Lordelo, Padrela e Rapid a 4°C e 8°C.

A modalidade 1hora a 4°C foi a que, no conjunto das variedades / populações, apresentou maior número de células no padrão PD. No final de uma hora de frio foi também possível observar, embora com pouca frequência (dados não incluídos) alguns distúrbios nos MT constituintes do fuso. Com efeito registaram-se casos em que os MT do fuso despolimerizaram constituindo C-metáfases (Fig.11). Casos semelhantes não foram observados em qualquer das modalidades 4horas ou 24horas de frio.

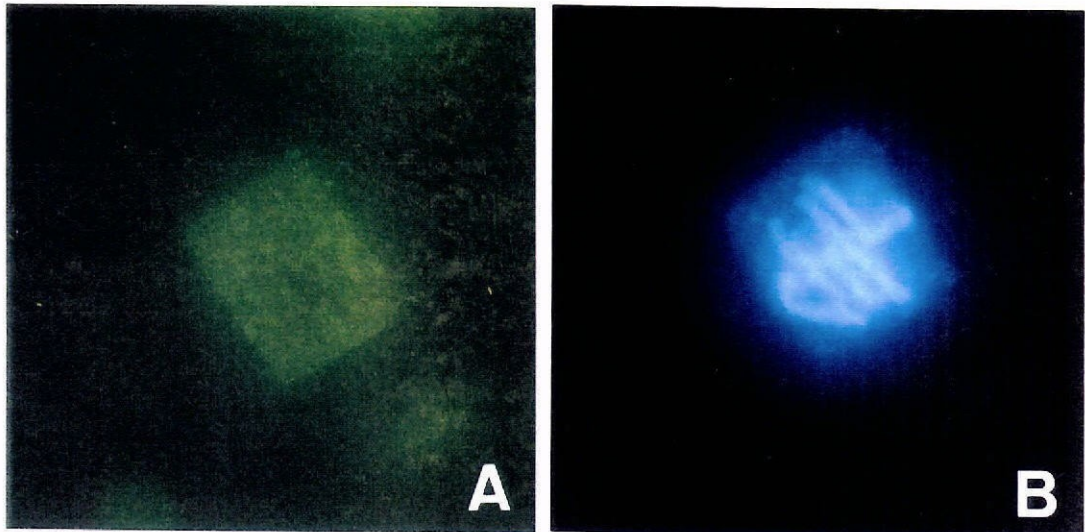


Fig. 11 - Células de ápices radiculares de centeio tratadas com anticorpo anti-tubulina. Célula metafásica em que houve despolimerização dos MT constituintes do fuso. Variedade Rapid, modalidade 4°C-1h. Ampliação 135x. **A**-Marcação anti-tubulina; **B**-Dapi.

O comportamento diferencial dos MTC das diferentes variedades / populações após 24horas de frio poderá contribuir para o seu comportamento morfológico, sendo as variedades / populações que mais rapidamente recuperam o padrão de MT para um padrão mais organizado as que apresentam também o melhor crescimento radicular a 4°C (Padrela e Lordelo), ou, caso da variedade Gambit e população Lordelo, se comportam de forma semelhante a 4°C ou 8°C. As variedades / populações que demoram mais tempo na sua recuperação sofrem maiores quebras de crescimento radicular a baixas temperaturas, caso de Rapid e Dank nowe que, sendo as variedades que apresentam o maior crescimento a 8°C, apresentam diferenças significativas nas curvas de crescimento radicular.

Os resultados indicam existir uma correlação entre comportamento morfológico e grau de resistência dos MT ao frio.

Contrariamente ao que seria de esperar numa primeira aproximação, não são as variedades oriundas de latitudes mais elevadas, com invernos mais rigorosos, as que apresentam MT mais resistentes ao frio nem um melhor crescimento a baixas temperaturas. No entanto os resultados alcançados neste trabalho estão de acordo com os resultados de ensaios de campo realizados para análise comparativa de curvas de crescimento. Com efeito nesses ensaios, levados a cabo em diversas estações experimentais, as variedades Rapid e Dank nowe apresentam um crescimento inicial muito lento comparativamente a populações regionais portuguesas que no período invernal apresentam um crescimento mais rápido mesmo a baixas temperaturas (comunicação pessoal da Prof. Olinda Carnide). As variedades Dank nowe e Rapid embora no período inicial de desenvolvimento passem por uma fase estacionária recuperam o desenvolvimento na primavera quando as temperaturas se tornam mais amenas.

Em termos morfológicos podemos dizer que as variedades Dank nowe e Rapid pelo facto de passarem por uma fase estacionária do desenvolvimento, com um porte rasteiro, estarão mais adaptadas a suportar a neve e as baixas temperaturas. As populações portuguesas apresentam um desenvolvimento mais contínuo no período invernal sendo mais precoces no espigamento e na floração relativamente às restantes variedades.

O comportamento morfológico apresentado pelas diferentes variedades e populações poderá estar intimamente relacionado com o grau de resistência dos MT. Um desenvolvimento mais contínuo durante o período invernal poderá depender da alteração dos MT, por comparação com variedades que apresentando mais fraco desenvolvimento não alterariam os seus MT.

O mecanismo pelo qual os MT se tornam resistentes às baixas temperaturas ainda não está completamente esclarecido mas, como já se fez referência (pág. 8) diversos estudos indicam que poderá verificar-se o envolvimento de diferentes isótipos de tubulina na constituição dos MT (Kerr e Carter, 1990-a; Chu *et al.*, 1993). Uma hipótese a considerar, e que não estaria em desacordo com os resultados até agora alcançados pelos diversos cientistas, bem como com os resultados deste trabalho, seria a capacidade que as plantas teriam, quando sujeitas a baixas temperaturas, de após despolimerizarem os seus MT, repolimerizarem novos MT com outras características. As novas propriedades poderiam advir da incorporação de diferentes isótipos, ou da alteração das proporções em que inicial-

mente ocorreriam. Por outro lado, diferentes isótipos poderão possuir locais de ligação a MAP com diferente afinidade permitindo que a eles se liguem umas MAP em detrimento de outras. Estas poderão, por sua vez, possuir uma diferente afinidade para Ca^{2+} , permitindo também uma regulação por este ião (Schellenbaum *et al.*, 1992).

Os resultados alcançados neste trabalho estão ainda de acordo com os apresentados por Chu e colaboradores (1993) em *Arabidopsis thaliana*, pois estes autores registam a ocorrência de alterações no nível de transcritos de três isótipos de β -tubulina no final de seis horas de tratamento a 4°C. Com efeito apenas foi possível observar o aparecimento de MT resistentes ao frio no final de 24 horas não se registando esse facto no final de 4 horas de frio.

Para esclarecimento do mecanismo através do qual os MT conseguem recuperar para padrões mais organizados e semelhantes a temperaturas que não induzem a stress, será necessário a realização de estudos mais detalhados, que detetem quer a presença de diferentes isótipos de tubulina, quer a presença de diferentes MAP. No entanto, dever-se-á previamente confirmar a ocorrência de variabilidade genética, não só com outras variedades / populações dentro de *Secale cereale*, como também utilizando outras espécies que apresentem grandes amplitudes varietais de comportamento.

A partir dos resultados alcançados neste trabalho poder-se-ão desenvolver várias linhas de acção

- procura e confirmação de variabilidade genética com populações de origem ainda mais diversa quer em *Secale cereale* L. ou noutra espécie;
- Utilização de tempos mais longos de exposição ao frio, procurando verificar se variedades que apresentem um fraco desenvolvimento a baixas temperaturas conseguem apresentar MT resistentes ao frio ou mantêm o mesmo padrão de despolimerização.
- Procura do mecanismo pelo qual os MT se tornam mais resistentes ao frio tirando partido de variedades com comportamentos extremos no que respeita à apresentação ou não deste tipo de MT.

8. Conclusões

O estudo realizado sobre o grau de polimerização dos MTC em variedades / populações de *Secale cereale* L., sujeitas a stress térmico - 4°C e 8°C - e cujos resultados e discussão foi apresentada nas páginas anteriores, permite-nos concluir:

i) Há um efeito das diferentes temperaturas na polimerização dos MTC, diminuindo o grau de polimerização e organização com a severidade do tratamento.

ii) Para todos os tratamentos não se encontrou variabilidade intravarietal significativa.

iii) As variedades / populações estudadas não apresentam diferenças significativas entre si na sensibilidade dos seus MTC aos tratamentos de 20°C e de 8°C.

iv) As variedades / populações estudadas apresentam diferenças significativas de comportamento após 24 horas de incubação a 4°C, distinguindo-se dois tipos de comportamento: as que no final do tratamento apresentam uma elevada despolimerização dos MTC, e as que recuperam o padrão de organização para valores semelhantes aos observados no tratamento de 20°C.

v) Parece haver uma relação entre o crescimento radicular e a sensibilidade dos MTC ao frio. Variedades que mantêm uma maior despolimerização dos MTC no final de 24 horas a 4°C são também aquelas que apresentam uma diferença significativa entre as curvas de crescimento radicular a 4°C e 8°C, com um crescimento significativamente menor a 4°C. Variedades que repolimerizam os seus MTC no final de 24 horas a 4°C, apresentam, ou elevados valores de crescimento radicular a 4°C, ou têm curvas de crescimento radicular a 4°C e 8°C que não diferem significativamente.

Referências bibliográficas

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J., (1989). **Molecular Biology of the Cell**. 2^a edition, Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Baluska, F., Parker, J.S. and Barlow, P.W. (1992). Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with growth and tissue differentiation in roots of maize (*Zea mays*). *Journal of Plant Science*, **103**: 191-200.
- Baluska, F., Parker, J.S. and Barlow, P.W. (1993-a). A role for gibberellic acid in orienting microtubules and regulating cell growth polarity in maize root cortex. *Planta*, **191**: 149-157.
- Baluska, F., Parker, J.S., and Barlow, P.W. (1993-b). The microtubular cytoskeleton in cells of cold-treated roots of maize (*Zea mays* L.) shows tissue-specific responses. *Protoplasma*, **172**: 84-96.
- Bartolo, M. E. and Carter, J. V. (1991-a). Microtubules in Mesophyll Cells of Nonacclimated and Cold-Acclimated Spinach. *Plant Physiology*, **97**: 175-181.
- Bartolo, M. E. and Carter, J. V. (1991-b). Effect of Microtubule stabilization on Freezing Tolerance of Mesophyll Cells of Spinach. *Plant Physiology*, **97**: 182-187.
- Bartolo, M.E. and Carter, J.V. (1992). Lithium Decreases Cold-Induced Microtubule Depolymerization in Mesophyll Cells of Spinach. *Plant Physiology*, **99**: 1716-1718.
- Burns, Roy. (1988) Chromosome Movement *in vitro*. *Nature*, vol 331, 11 February: 479.

- Carvalho, M.J. R. (1988) " **A Estatística aplicada à experimentação agrícola**"
Edições Afrontamento, Porto.
- Chu, B., Snustad, D. and Carter, J. (1993). Alteration of β -Tubulin Gene Expression during Low-Temperature Exposure in Leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, **103**: 371-377.
- Clayton, L. and Lloyd, C.W. (1984). The relationship between the division plane and spindle geometry in *Allium* cells treated with CIPC and griseofulvin: an anti-tubulin study. *European Journal of Cell Biology*, **34**: 248-253.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990) "**Molecular Cell Biology**" Scientific American Books, W.H. Freeman Company, New York.
- Dustin, P. (1980). Microtubules. *Scientific American*, Aug, vol **293**, (2): 59-68.
- Eleftheriou, E.P. (1994). Abnormal structure of protophloem sieve-element cell wall in colchicine-treated roots of *Triticum aestivum* L.. *Planta*, **193**: 266-274.
- Eleftheriou, E.P. and Palevitz, B.A. (1992). The Effect of Cytochalasin D on Preprophase Band Organization in Root Tip Cells of *Allium*. *Journal of Cell Science*, **103**: 989-998.
- Emons, A.M.C., Derksen, J. and Sassen, M.M.A. (1992). Do Microtubules Orient Plant Cell Wall Microfibrils?. *Physiologia Plantarum*, **84**: 486-493.
- Ferreira, J.F.D. (1992). Citoesqueleto - Composição, Organização e Significado Funcional, in Azevedo, Carlos (1992). "**Biologia celular**" Fundação Gomes Teixeira. Porto, pp189-200.
- Fosket, D.E. and Morejohn, L.C. (1992). Structural and Functional Organization of Tubulin. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Physiology*, **43**: 201-240.
- Gelfand, V.I. and Scholey, J.M. (1992). Every motion has its motor. *Nature*, vol **359**, 8 October: 480-482.

- Gull,K., Hussey,P.J., Sasse,R., Sneider,A., Seebeck,T. and Sherwin,T. (1986). Tubulin isotypes: Generation of diversity in Cells and Microtubular Organelles. *Journal of Cell Science Suppl.*, **5**: 243-255.
- Gunning,B.E.S. and Hardham,A.R. (1982). Microtubules. *Annual Revue of Plant Physiology*, **33**: 651-698.
- Gunning, B.E.S. and Wick,S.M. (1985). Preprophase Bands, Phragmoplasts, and Spatial Control of Cytokinesis. *Journal of Cell Science Suppl.*, **2**: 157-179.
- Hasezawa,S. and Nagata,T. (1993). Microtubule organizing centers in plant cells: localization of a 49 kDa protein that is immunologically cross-reactive to a 51 kDa protein from a sea urchin centrosomes in synchronized tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, **176**: 64-74.
- Hollenbeck, P. (1985). Mitotic spindles in isolation. *Nature*, vol 316, 1 August: 393-394.
- Hugdahl,J.D., Bokros,C.L., Hanesworth,R. Aalund,G.R., and Morejohn,L.C. (1993). Unique Functional Characteristics of the Polymerization and MAP Binding Regulatory Domains of Plant Tubulin. *The Plant Cell*, Vol **5**: 1063-1080.
- Kaneta, T., Kakimoto, T. and Shibaoka, H. (1993). Actinomycin D Inhibits the GA3-Induced Elongation of Azuki Bean Epicotyls and Reorientation of Cortical Microtubules. *Plant Cell Physiology*, **34** (7): 1125-1132.
- Kerr, G. P. and Carter, J.V.(1990-a). Relationship between Freezing Tolerance of Root-tip cells and Cold Stability of Microtubules in Rye (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology*, **93**: 77-82.
- Kerr, G. P. and Carter, J.V.(1990-b). Tubulin Isotypes in Rye Roots Are Altered during Cold Acclimation. *Plant Physiology*, **93**: 83-88.
- Koshland, D.E.; Mitchison,T.J.; Kirschner,M.W.(1988). Polewards Chromosome Movement Driven by Microtubule Depolymerization *in vitro*. *Nature*, vol **331**, 11 Feb: 499-504.

- Laporte,K., Rossignol,M. and Traas,J.A. (1993). Interaction of tubulin with the plasma membrane: tubulin is present in purified plasmalema and behaves as an integral membrane protein. *Planta*, **191**: 413-416.
- Lechner,M.C. e Ribeiro,V. (1992). Replicação do DNA, *in* Azevedo, Carlos (1992) **Biologia celular**. Fundação Gomes Teixeira. Porto, pp. 133-144.
- Liu,B., Marc,J., Joshi, H., and Palevitz,B.A. (1993). A γ -Tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Science*, **104**:1217-1228.
- Lloyd, C. W.(1987). The plant cytoskeleton: Impact of Fluorescence Microscopy. *Annual Revue of Plant Physiology*, **38**: 119-139.
- Lloyd,C.W.; Clayton,L.; Dawson,P.J.; Doonan,J.H.; Hulme,J.S.; Roberts,I.N.; Wells,B.(1985). The Cytoskeleton Underlying Side Walls and Cross Walls in Plants: Molecules and Macromolecular Assemblies. *J.Cell Sc. Suppl.*, **2**: 143-155.
- Loewy, A.G., Siekevitz, P., Menninger, John, R. and Gallant, J. A. N. (1991) **"Cell Structure & Function"** Third Edition, Saunders College Publishing.
- Mader, S.S. (1993) **"Biology"** Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, USA.
- Marchant,H.J. (1979). Microtubules, cell wall deposition and the determination of plant cell shape. *Nature*, Vol **278**, 8 March.
- Mitchison,T. & Kirschner,M. (1984-a). Microtubules assembly by isolated centrosomes. *Nature* Vol **312**. 15 November: 232-237.
- Mitchison,T. & Kirschner,M. (1984-b). Dynamic instability of microtubules-growth. *Nature* Vol **312**. 15 November: 237-242.
- Mizuno, Koichi (1992). Induction of Cold Stability of Microtubules in cultured Tobacco Cells. *Plant phisiology*, **100**: 740-748.

- Nagata, T., Kumagai, F. and Hasezawa, S. (1994). The origin and organization of cortical microtubules during the transition between M and G1 phases of the cell cycle as observed in highly synchronized cells of tobacco BY-2. *Planta*, **193**: 567-572.
- Okamura, S., Kakiuchi, M., Sano, A. and Kawajiri, M. (1993). Loss of tubulin during cold treatment of cultured carrot cells. *Physiologia Plantarum*, **88**: 93-98.
- Parker, R.E. (1973). **Introductory Statistics for Biology**. Edward Arnold. London.
- Pousada, C.R. e Soares, M.H. (1992). Microtúbulos, in Azevedo, Carlos (1992) **Biologia celular**. Fundação Gomes Teixeira. Porto, pp 189-200.
- Sakiyama-Sogo, M. and Shibaoka, H. (1993). Gibberellin A3 and Abscisic Acid Cause the Reorientation of Cortical Microtubules in Epicotyl Cells of the Decapitated Dwarf Pea. *Plant Cell Physiology*, **34** (7): 431-437.
- Schellenbaum, P., Vantard, M. and Lambert, A. (1992). Higher plant microtubule-associated proteins (MAPs): A survey. *Biology Cell*, **76**: 359-364.
- Shibaoka, H. (1994). Plant Hormone-Induced Changes in the Orientation of Cortical Microtubules: Alterations in the Cross-linking Between Microtubules and the Plasma Membrane. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, **45**: 527-544.
- Sloboda, R.D.; Dentler, W.L.; Rosenbaum, J.L. (1976). Microtubule-Associated Proteins and Stimulation of Tubulin Assembly *in vitro*. *Biochemistry*, vol **15** (20): 4497-4505.
- Staiger, C.J. and Schliwa, M. (1987). Actin Localization and Function in Higher Plants. *Protoplasma*, **141**: 1-12.
- Stoppin, V., Vantard, M., Schmit, A.C. and Lambert, A.M. (1994). Isolated Plant Nuclei Nucleated Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants has Centrosome-like Activity. *The Plant Cell*, **6**: 1099-1106.

- Utrilla,L., Giménez-Abián,M.I., De la Torre,C. (1993). Timing the phases of microtubule cycles involved in cytoplasmic and nuclear divisions in cells of undisturbed onion root meristems. *Biology of the Cell*, **78**: 235-241.
- Weingarten, M.D.; Lockwood, A.H.; Hwo, S. and Kirschner, M.W. (1975). A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. **72** (5): 1858-1862.
- Yasuhara, H., Sonobe, S. and Shibaoka, H. (1992). ATP-Sensitive Binding to Microtubules of polypeptides Extracted from Isolated Phragmoplasts of Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiology*, **33**: 601-608.
- Zandomeni, K. and Schopfer,P. (1993). Reorientation of microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles by phytochrome, blue-light photoreceptor, and auxin. *Protoplasma*, **173**: 103-112.

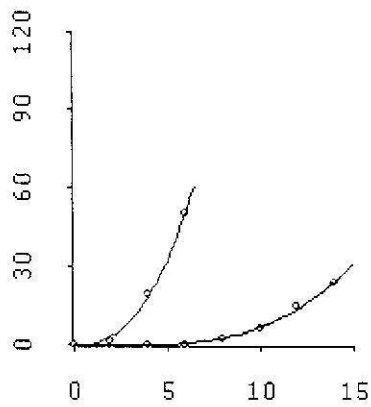
ANEXOS

ANEXO I

I.1. Funções de crescimento ($y=a x^n$) e valores do estimador de n

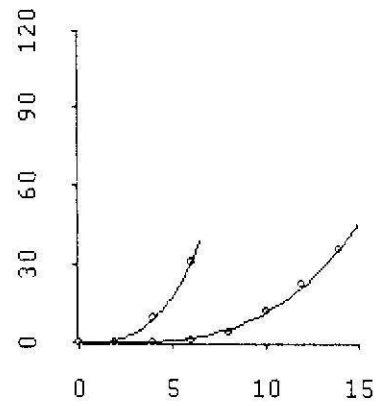
Variedade Amando

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 2,44 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,77$$



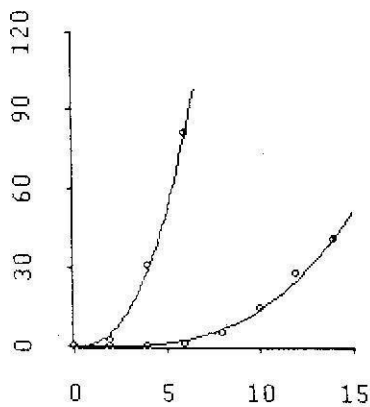
Variedade Gambit

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 3,007 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,39$$



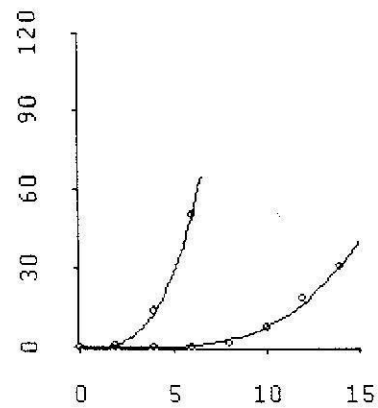
Variedade Dank nowe

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 2,44 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,18$$



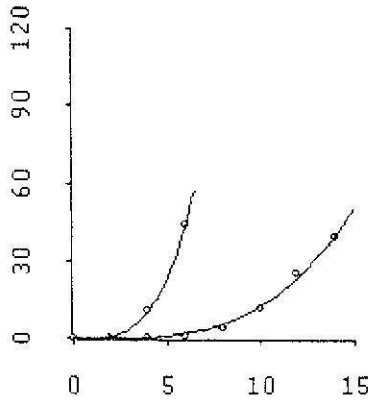
Variedade Hacada

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 3,22 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,98$$



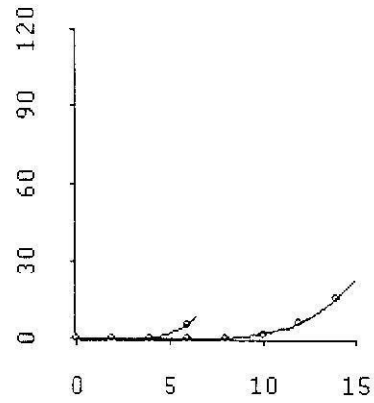
Variedade Halo

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 3,47 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,45$$



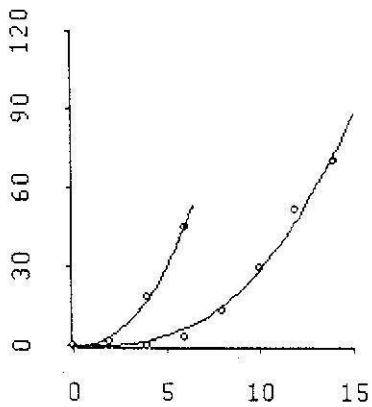
Variedade Marder

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 5,02 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 5,8$$



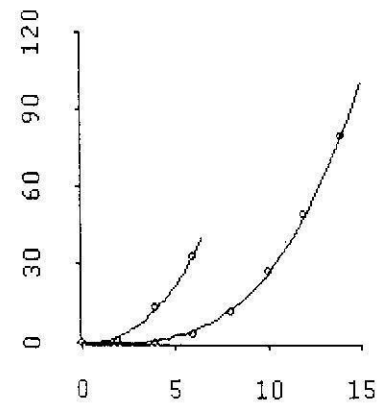
População Lordelo

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 2,29 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 2,79$$



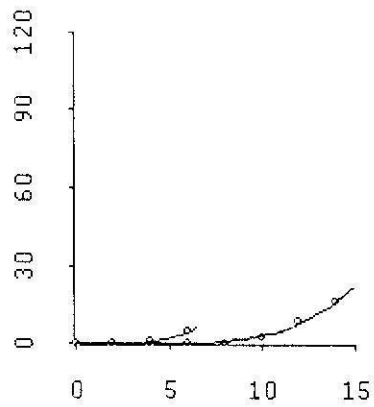
População Padrela

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 2,32 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,26$$



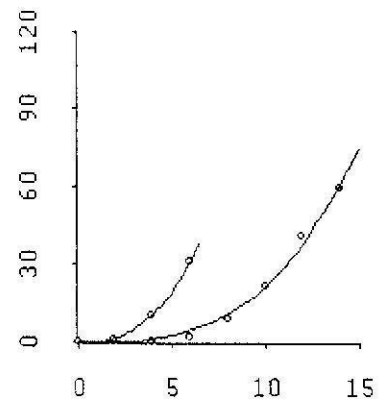
Variedade Peras

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 3,8 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 4,8$$



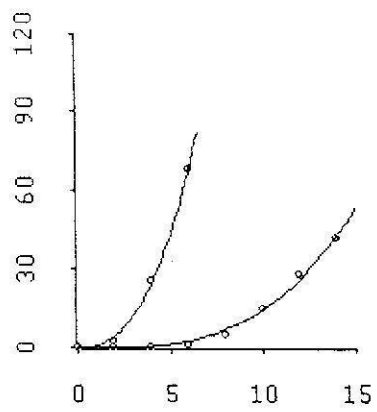
Variedade Warko

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 2,67 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,109$$



Variedade Rapid

$$n(8^{\circ}\text{C}) = 2,45 \quad n(4^{\circ}\text{C}) = 3,23$$



I.2. Definição da função de crescimento e dados de crescimento radicular

Ficheiro expl.isp

```
(defun exp1 (theta)
  (* (select theta 0) (^ x (select theta 1))))
)

(def x1 '(0 2 4 6 8 10 12 14))
(def x2 '(0 2 4 6))

(def amando1 '(0 0 .033 .43 2.4 6.87 14.73 24.51))
(def amando2 '(0 1.55 19.8 50.6))

(def dank1 '(0 0 .013 .85 5.63 15.07 28.04 41.11))
(def dank2 '(0 2.94 31.56 81.33))

(def gambit1 '(0 0 .067 .79 4.45 11.93 22.8 35.7))
(def gambit2 '(0 .55 9.4 31.1))

(def hacada1 '(0 0 .02 .57 2.2 7.8 18.67 31.03))
(def hacada2 '(0 .85 13.95 50.9))

(def halo1 '(0 0 .053 1.17 4.62 12.37 26 39.73))
(def halo2 '(0 .6 10.95 44.5))

(def locarmo1 '(0 0 .06 .83 3.66 10.21 20.73 33.77))
(def locarmo2 '(0 .65 7.9 22.85))

(def lordelo1 '(0 0 .36 3.11 13.21 30.07 52.6 71.13))
(def lordelo2 '(0 2.3 18.75 45.35))

(format t "~a~%" "AMANDO")
(def x x1)
(def modamando1 (nreg-model #'exp1 amando1 (list .001 4.)))
(def x x2)
(def modamando2 (nreg-model #'exp1 amando2 (list .0001 2.)))
```

```

(print
(/ (- (select (send modamando1 :coef-estimates) 1)
      (select (send modamando2 :coef-estimates) 1))
  (** (* 2 (/ (+ (* 6 (** (select (send modamando1 :coef-standard-errors) 1) 2))
                (* 2 (** (select (send modamando2 :coef-standard-errors) 1) 2))
                ) 8)) .5)
)
)

```

```

(format t "~%o~%o~%o~a~%" "DANK")
(def x x1)
(def moddank1 (nreg-model #'exp1 dank1 (list .001 4.)))
(def x x2)
(def moddank2 (nreg-model #'exp1 dank2 (list .0001 2.)))
(print
(/ (- (select (send moddank1 :coef-estimates) 1)
      (select (send moddank2 :coef-estimates) 1))
  (** (* 2 (/ (+ (* 6 (** (select (send moddank1 :coef-standard-errors) 1) 2))
                (* 2 (** (select (send moddank2 :coef-standard-errors) 1) 2))
                ) 8)) .5)
)
)

```

```

(format t "~%o~%o~%o~a~%" "GAMBIT")
(def x x1)
(def modgambit1 (nreg-model #'exp1 gambit1 (list .001 4.)))
(def x x2)
(def modgambit2 (nreg-model #'exp1 gambit2 (list .0001 2.)))
(print
(/ (- (select (send modgambit1 :coef-estimates) 1)
      (select (send modgambit2 :coef-estimates) 1))
  (** (* 2 (/ (+ (* 6 (** (select (send modgambit1 :coef-standard-errors) 1) 2))
                (* 2 (** (select (send modgambit2 :coef-standard-errors) 1) 2))
                ) 8)) .5)
)
)

```

```

(format t "~%o~%o~%o~a~%" "HACADA")
(def x x1)
(def modhacada1 (nreg-model #'exp1 hacada1 (list .001 4.)))
(def x x2)
(def modhacada2 (nreg-model #'exp1 hacada2 (list .0001 2.)))
(print
(/ (- (select (send modhacada1 :coef-estimates) 1)
      (select (send modhacada2 :coef-estimates) 1))
)
)

```



```
(def marder1 '(0 0 0 .092 .31 2.25 6.5 15.88))
(def marder2 '(0 0 .75 5.75))
```

```
(def padrela1 '(0 0 .271 3.22 12.23 28.21 49.57 80.38))
(def padrela2 '(0 1.14 14 33.71))
```

```
(def peras1 '(0 0 0 .037 .21 2.87 8.87 16.38))
(def peras2 '(0 0 1 4.65))
```

```
(def rapid1 '(0 0 .1 1.27 5.4 15.17 28.5 42.47))
(def rapid2 '(0 2.95 26.1 68.2))
```

```
(def warko1 '(0 0 .18 2.15 8.93 22.03 41.33 60))
(def warko2 '(0 1.15 10.8 31.3))
```

```
(format t "~%~%~%~%~%~%~%~%~%~%" "MARDER")
(def x x1)
(def modmarder1 (nreg-model #'expl marder1 (list .000001 7.5)))
(def x x2)
(def modmarder2 (nreg-model #'expl marder2 (list .0003 7.)))
(print
 (/ (- (select (send modmarder1 :coef-estimates) 1)
       (select (send modmarder2 :coef-estimates) 1))
    (** (* 2 (/ (+ (* 6 (** (select (send modmarder1 :coef-standard-errors) 1) 2))
                  (* 2 (** (select (send modmarder2 :coef-standard-errors) 1) 2))
                ) 8)) .5)
 )
 )
```

```
(format t "~%~%~%~%~%~%~%~%~%~%" "PADRELA")
(def x x1)
(def modpadre1 (nreg-model #'expl padre1 (list .001 4.)))
(def x x2)
(def modpadre2 (nreg-model #'expl padre2 (list .0001 2.)))
(print
 (/ (- (select (send modpadre1 :coef-estimates) 1)
       (select (send modpadre2 :coef-estimates) 1))
    (** (* 2 (/ (+ (* 6 (** (select (send modpadre1 :coef-standard-errors) 1) 2))
                  (* 2 (** (select (send modpadre2 :coef-standard-errors) 1) 2))
                ) 8)) .5)
 )
```


I.3. Estimadores de a e n das funções de crescimento a 4°C e 8°C para cada variedade ou população

; loading "expl.lsp"

AMANDO

Residual sum of squares: 242.922
 Residual sum of squares: 6.94967
 Residual sum of squares: 1.58114
 Residual sum of squares: 1.58079

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.0011656 (0.000474256)
 Parameter 1 3.77694 (0.157611)

R Squared: 0.997232
 Sigma hat: 0.513288
 Number of cases: 8
 Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 2954.37
 Residual sum of squares: 21.3928
 Residual sum of squares: 14.5338
 Residual sum of squares: 11.1642
 Residual sum of squares: 9.91709
 Residual sum of squares: 5.67164
 Residual sum of squares: 4.59737
 Residual sum of squares: 4.59622
 Residual sum of squares: 4.59622

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.634831 (0.209098)
 Parameter 1 2.44605 (0.188782)

R Squared: 0.997232
 Sigma hat: 1.51595
 Number of cases: 4
 Degrees of freedom: 2

5.67077

DANK

Residual sum of squares: 88.9223
 Residual sum of squares: 86.9784
 Residual sum of squares: 84.9107
 Residual sum of squares: 82.7416
 Residual sum of squares: 82.369
 Residual sum of squares: 80.8965
 Residual sum of squares: 78.5164
 Residual sum of squares: 75.4441
 Residual sum of squares: 71.8874
 Residual sum of squares: 70.4606
 Residual sum of squares: 65.728
 Residual sum of squares: 63.8883
 Residual sum of squares: 58.07124
 Residual sum of squares: 18.3717
 Residual sum of squares: 13.1797
 Residual sum of squares: 13.1769
 Residual sum of squares: 13.1769

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.00952707 (0.00532954)
 Parameter 1 3.18183 (0.218065)

R Squared: 0.992282
 Sigma hat: 1.48194
 Number of cases: 8
 Degrees of freedom: 5

Residual sum of squares: 7618.56
 Residual sum of squares: 51.593
 Residual sum of squares: 33.4607
 Residual sum of squares: 24.8234
 Residual sum of squares: 21.7725
 Residual sum of squares: 11.5869
 Residual sum of squares: 8.58143
 Residual sum of squares: 8.57936
 Residual sum of squares: 8.57936

Least Squares Estimates:

Parameter 0 1.017461 (0.285233)
 Parameter 1 2.44727 (0.160672)

R Squared: 0.997988
 Sigma hat: 2.071154
 Number of cases: 4
 Degrees of freedom: 2

2.53092

GAMBIT

Residual sum of squares: 15.779
 Residual sum of squares: 12.4317
 Residual sum of squares: 11.3563
 Residual sum of squares: 11.007555
 Residual sum of squares: 10.7365
 Residual sum of squares: 10.3416
 Residual sum of squares: 9.81387
 Residual sum of squares: 9.20715
 Residual sum of squares: 8.80961
 Residual sum of squares: 8.58487
 Residual sum of squares: 5.63114
 Residual sum of squares: 4.88396
 Residual sum of squares: 4.88386
 Residual sum of squares: 4.88386

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.0046897 (0.00200954)
 Parameter 1 3.39328 (0.166622)

R Squared: 0.996062
 Sigma hat: 0.902206
 Number of cases: 8
 Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 1055.62
 Residual sum of squares: 23.5077
 Residual sum of squares: 20.1828
 Residual sum of squares: 17.3732
 Residual sum of squares: 17.2074
 Residual sum of squares: 14.1748
 Residual sum of squares: 12.7943
 Residual sum of squares: 1.2412
 Residual sum of squares: 0.398595
 Residual sum of squares: 0.394814

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.142354 (0.0294831)
 Parameter 1 3.0070151 (0.117562)

R Squared: 0.999378
 Sigma hat: 0.444305

Number of cases: 4
Degrees of freedom: 2

1.75294

HACADA

Residual sum of squares: 67.8392
Residual sum of squares: 4.82697
Residual sum of squares: 4.75168
Residual sum of squares: 4.75168

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.000860129 (0.000509924)
Parameter 1 3.98315 (0.229246)

R Squared: 0.994852
Sigma hat: 0.889914
Number of cases: 8
Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 2785.72
Residual sum of squares: 81.6038
Residual sum of squares: 78.01969
Residual sum of squares: 69.2302
Residual sum of squares: 60.8416
Residual sum of squares: 52.7345
Residual sum of squares: 50.5357
Residual sum of squares: 39.4313
Residual sum of squares: 29.6191
Residual sum of squares: 1.95948
Residual sum of squares: 0.423985
Residual sum of squares: 0.419997

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.157312 (0.0226785)
Parameter 1 3.22587 (0.0816083)

R Squared: 0.999754
Sigma hat: 0.458256
Number of cases: 4
Degrees of freedom: 2

2.64192

HALO

Residual sum of squares: 35.3851
Residual sum of squares: 34.4063
Residual sum of squares: 33.2159
Residual sum of squares: 31.8669
Residual sum of squares: 31.7759
Residual sum of squares: 30.3244
Residual sum of squares: 28.04211
Residual sum of squares: 26.6482
Residual sum of squares: 24.6571
Residual sum of squares: 10.9348
Residual sum of squares: 8.35735
Residual sum of squares: 8.35654
Residual sum of squares: 8.35653

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.00448967 (0.00229836)
Parameter 1 3.45219 (0.198933)

R Squared: 0.994607
Sigma hat: 1.18015
Number of cases: 8
Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 2100.16
Residual sum of squares: 80.06547
Residual sum of squares: 63.4992
Residual sum of squares: 53.6265
Residual sum of squares: 47.3755
Residual sum of squares: 42.7566
Residual sum of squares: 38.6587
Residual sum of squares: 34.6001
Residual sum of squares: 30.4824
Residual sum of squares: 26.3933
Residual sum of squares: 24.7071
Residual sum of squares: 18.9845
Residual sum of squares: 13.667
Residual sum of squares: 1.098665
Residual sum of squares: 0.148744
Residual sum of squares: 0.148021

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.0872921 (0.00955051)
Parameter 1 3.47943 (0.0617741)

R Squared: 0.999887
Sigma hat: 0.272048
Number of cases: 4
Degrees of freedom: 2

-0.110056

LOCARMO

Residual sum of squares: 22.07538
Residual sum of squares: 6.2423
Residual sum of squares: 5.87955
Residual sum of squares: 5.61313
Residual sum of squares: 3.47236
Residual sum of squares: 2.91843
Residual sum of squares: 2.91837

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.00249838 (0.000947366)
Parameter 1 3.60958 (0.147117)

R Squared: 0.99732
Sigma hat: 0.69742
Number of cases: 8
Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 584.765
Residual sum of squares: 7.40065
Residual sum of squares: 5.30996
Residual sum of squares: 4.42832
Residual sum of squares: 3.45412
Residual sum of squares: 2.91056
Residual sum of squares: 0.645605
Residual sum of squares: 0.338983
Residual sum of squares: 0.338633

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.182954 (0.0411753)

Parameter 1 2.69542 (0.128364)
R Squared: 0.999
Sigma hat: 0.411481
Number of cases: 4
Degrees of freedom: 2

4.53109

LORDELO

Residual sum of squares: 2574.69
Residual sum of squares: 2540.55
Residual sum of squares: 2536.091
Residual sum of squares: 2509.9
Residual sum of squares: 2465.67
Residual sum of squares: 2406.99
Residual sum of squares: 2392.4
Residual sum of squares: 2309.59
Residual sum of squares: 2280.41
Residual sum of squares: 2212.73
Residual sum of squares: 1544.29
Residual sum of squares: 224.557
Residual sum of squares: 66.106
Residual sum of squares: 53.1943
Residual sum of squares: 53.1915
Residual sum of squares: 53.1915

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.0460661 (0.0253379)
Parameter 1 2.79596 (0.215573)

R Squared: 0.989929
Sigma hat: 2.97746
Number of cases: 8
Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 2413.087
Residual sum of squares: 8.70288
Residual sum of squares: 6.87722
Residual sum of squares: 4.76645
Residual sum of squares: 2.5107
Residual sum of squares: 2.5095

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.751175 (0.187816)
Parameter 1 2.29088 (0.143824)

R Squared: 0.998086
Sigma hat: 1.12016
Number of cases: 4
Degrees of freedom: 2

1.78518 ""

""

>

; loading "exp2.lsp"

MARDER

Residual sum of squares: 158024
Residual sum of squares: 4565.55
Residual sum of squares: 419.401
Residual sum of squares: 3.49716
Residual sum of squares: 3.41569
Residual sum of squares: 3.29569
Residual sum of squares: 3.14703
Residual sum of squares: 2.97851
Residual sum of squares: 2.93513
Residual sum of squares: 2.73651
Residual sum of squares: 2.45118
Residual sum of squares: 2.25767
Residual sum of squares: 2.04012
Residual sum of squares: 0.515916
Residual sum of squares: 0.0887809
Residual sum of squares: 0.0886443

Least Squares Estimates:

Parameter 0 2.98187e-06 (7.92088e-07)
Parameter 1 5.86929 (0.101679)

R Squared: 0.999599
Sigma hat: 0.121549
Number of cases: 8
Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 6137.41
Residual sum of squares: 390.19
Residual sum of squares: 31.8164
Residual sum of squares: 0.136908
Residual sum of squares: 0.126564
Residual sum of squares: 0.11223
Residual sum of squares: 0.101391
Residual sum of squares: 0.0885614
Residual sum of squares: 0.0185761
Residual sum of squares: 0.000529761
Residual sum of squares: 0.000527986

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.000700915 (6.73781e-05)
Parameter 1 5.029889 (0.053831)

R Squared: 0.999977
Sigma hat: 0.0162479
Number of cases: 4
Degrees of freedom: 2

6.4461

PADRELA

Residual sum of squares: 2993.85
Residual sum of squares: 2897.68
Residual sum of squares: 2880.36
Residual sum of squares: 2839.55
Residual sum of squares: 2159.65
Residual sum of squares: 609.724
Residual sum of squares: 7.96666
Residual sum of squares: 7.63295
Residual sum of squares: 7.54794

Least Squares Estimates:

Parameter 0	0.0147526	(0.00336252)
Parameter 1	3.26239	(0.0887618)

R Squared:	0.998762
Sigma hat:	1.1216
Number of cases:	8
Degrees of freedom:	6

Residual sum of squares:	1333.38
Residual sum of squares:	7.28183
Residual sum of squares:	6.88857
Residual sum of squares:	4.8431
Residual sum of squares:	2.90686
Residual sum of squares:	2.90259
Residual sum of squares:	2.90259

Least Squares Estimates:

Parameter 0	0.523804	(0.192968)
Parameter 1	2.32747	(0.211722)

R Squared:	0.996062
Sigma hat:	1.2047
Number of cases:	4
Degrees of freedom:	2

5.053135

PERAS

Residual sum of squares:	174.0926
Residual sum of squares:	172.444
Residual sum of squares:	170.375
Residual sum of squares:	170.0841
Residual sum of squares:	167.772
Residual sum of squares:	163.887
Residual sum of squares:	161.487
Residual sum of squares:	161.201
Residual sum of squares:	143.566
Residual sum of squares:	9.61368
Residual sum of squares:	2.09488
Residual sum of squares:	2.042301
Residual sum of squares:	2.041861
Residual sum of squares:	2.04186

Least Squares Estimates:

Parameter 0	5.16878e-05	(4.83507e-05)
Parameter 1	4.80616	(0.359743)

R Squared:	0.991983
Sigma hat:	0.583361
Number of cases:	8
Degrees of freedom:	6

Residual sum of squares:	0.00689635
Residual sum of squares:	0.00503189

Least Squares Estimates:

Parameter 0	0.00491652	(0.00109897)
Parameter 1	3.8244	(0.125856)

R Squared:	0.999656
Sigma hat:	0.050158
Number of cases:	4

Degrees of freedom: 2

2.18415

RAPID

Residual sum of squares: 105.169
Residual sum of squares: 102.4
Residual sum of squares: 101.921
Residual sum of squares: 99.9129
Residual sum of squares: 96.6797
Residual sum of squares: 92.5353
Residual sum of squares: 92.4956
Residual sum of squares: 86.9832
Residual sum of squares: 86.5655
Residual sum of squares: 80.01959
Residual sum of squares: 19.3711
Residual sum of squares: 11.4122
Residual sum of squares: 11.4058
Residual sum of squares: 11.4057

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.00847452 (0.00437293)
Parameter 1 3.23749 (0.20101)

R Squared: 0.993656
Sigma hat: 1.37875
Number of cases: 8
Degrees of freedom: 6

Residual sum of squares: 5340.58
Residual sum of squares: 34.08992
Residual sum of squares: 21.5483
Residual sum of squares: 15.4253
Residual sum of squares: 13.295
Residual sum of squares: 5.85977
Residual sum of squares: 3.47203
Residual sum of squares: 3.47111

Least Squares Estimates:

Parameter 0 0.841207 (0.179733)
Parameter 1 2.45466 (0.122437)

R Squared: 0.998834
Sigma hat: 1.3174
Number of cases: 4
Degrees of freedom: 2

2.99973

WARKO

Residual sum of squares: 1058.81
Residual sum of squares: 1031.84
Residual sum of squares: 1025.84
Residual sum of squares: 995.222
Residual sum of squares: 947.12
Residual sum of squares: 917.084
Residual sum of squares: 906.615
Residual sum of squares: 658.232
Residual sum of squares: 24.7148
Residual sum of squares: 22.733
Residual sum of squares: 22.7327
Residual sum of squares: 22.7327

Least Squares Estimates:

Parameter 0	0.0168217	(0.00824111)
Parameter 1	3.10933	(0.191149)

R Squared:	0.993707
Sigma hat:	1.94648
Number of cases:	8
Degrees of freedom:	6

Residual sum of squares:	1097.39
Residual sum of squares:	12.781
Residual sum of squares:	8.89612
Residual sum of squares:	7.21222
Residual sum of squares:	5.52202
Residual sum of squares:	4.59955
Residual sum of squares:	0.905256
Residual sum of squares:	0.303201
Residual sum of squares:	0.302877

Least Squares Estimates:

Parameter 0	0.258742	(0.0398722)
Parameter 1	2.67725	(0.0879211)

R Squared:	0.999519
Sigma hat:	0.389151
Number of cases:	4
Degrees of freedom:	2

1.78379

ANEXO II

A II 1. Teste de χ^2 - Avaliação da homogeneidade intravarietal.

A II.1. Teste de χ^2 - Análise da homogeneidade a 20°C.

Amando	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
		MO	outros	total					
	1	36	14	50		39,6667	10,3333	2,521	28,35
20°C	2	42	8	50	esp. 20°C	39,6667	10,3333		
	3	41	9	50		39,6667	10,3333		

Dank nowe	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
		MO	outros	total					
	1	43	7	50		41,3333	8,6667	0,651	72,20
20°C	2	41	9	50	esp. 20°C	41,3333	8,6667		
	3	40	10	50		41,3333	8,6667		

Gambit	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
		MO	outros	total					
	1	42	8	50		43,3333	6,6667	0,461	79,39
20°C	2	44	6	50	esp. 20°C	43,3333	6,6667		
	3	44	6	50		43,3333	6,6667		

Hacada	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
		MO	outros	total					
	1	41	9	50		44	6	2,651	26,56
20°C	2	45	5	50	esp. 20°C	44	6		
	3	46	4	50		44	6		

Halo	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
		MO	outros	total					
	1	46	4	50		44	6	1,515	46,88
20°C	2	44	6	50	esp. 20°C	44	6		
	3	42	8	50		44	6		

Lordelo	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total		MO	outros		
	1	44	6	50		43,3333	6,6667	0,4615	79,39
20°C	2	44	6	50	esp. 20°C	43,3333	6,6667		
	3	42	8	50		43,3333	6,6667		

Padrela	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total		MO	outros		
	1	40	10	50		41	9	0,271	87,33
20°C	2	42	8	50	esp. 20°C	41	9		
	3	41	9	50		41	9		

Rapid	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total		MO	outros		
	1	42	8	50		42	8	0,297	86,17
20°C	2	41	9	50	esp. 20°C	42	8		
	3	43	7	50		42	8		

Warko	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total		MO	outros		
	1	37	13	50		39	11	4,429	10,92
20°C	2	36	14	50	esp. 20°C	39	11		
	3	44	6	50		39	11		

A II 2. Teste de χ^2 - Análise da homogeneidade a 8°C.

Dank nowe	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total					
8°C-1h		36	14	50	esp. 8°C	39	11	4,429	10,92
8°C-4h		44	6	50		39	11		
8°C-24h		37	13	50		39	11		

Gambit	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total					
8°C-1h		35	15	50	esp. 8°C	37,6667	12,3333	2,009	36,62
8°C-4h		37	13	50		37,6667	12,3333		
8°C-24h		41	9	50		37,6667	12,3333		

Lordelo	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total					
8°C-1h		38	12	50	esp. 8°C	36,6667	13,3333	1,091	57,96
8°C-4h		38	12	50		36,6667	13,3333		
8°C-24h		34	16	50		36,6667	13,3333		

Padrela	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total					
8°C-1h		36	14	50	esp. 8°C	36,6667	13,3333	3,341	18,82
8°C-4h		33	17	50		36,6667	13,3333		
8°C-24h		41	9	50		36,6667	13,3333		

Rapid	rep	padrão de Mt				MO	outros	χ^2	Prob. χ^2 (%)
Modalidade		MO	outros	total					
8°C-1h		37	13	50	esp. 8°C	36,3333	13,6667	0,067	96,67
8°C-4h		36	14	50		36,3333	13,6667		
8°C-24h		36	14	50		36,3333	13,6667		

A II 3. Teste de χ^2 - Análise da homogeneidade a 4°C -1 hora; 4°C-4horas e 4°C-24horas.

D. nowe	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-1h	1	35	11	4	50	esp. 4°C-1h	30	12	8	4.683	32.13
	2	28	13	9	50		30	12	8		
	3	27	12	11	50		30	12	8		

D. nowe	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-4h	1	32	5	12		esp. 4°C-4h	30.33	10	6.67	7.706	10.29
	2	29	15	6							
	3	30	10	10							

D. nowe	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-24h	1	31	12	7		esp. 4°C-24h	32.33	9.67	8	1.291	86.29
	2	34	8	8							
	3	32	9	9							

Gambit	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-1h	1	37	6	7	50	esp. 4°C-1h	30.67	8.33	11	7.031	13.42
	2	30	7	13	50		30.67	8.33	11		
	3	25	12	13	50		30.67	8.33	11		

Gambit	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-4h	1	37	6	7	50	esp. 4°C-4h	33	7	10	7.102	13.06
	2	32	4	14	50		33	7	10		
	3	30	11	9	50		33	7	10		

Gambit	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-24h	1	44	1	5	50	esp.4°C-24h	39	4.33	6.67	6.085	19.29
	2	38	5	7	50		39	4.33	6.67		
	3	35	7	8	50		39	4.33	6.67		

Lordelo	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-1h	1	40	4	6	50	esp. 4°C-1h	33	7.33	9.67	6.653	15.54
	2	30	9	11	50		33	7.33	9.67		
	3	29	9	12	50		33	7.33	9.67		

Lordelo	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-4h	1	33	10	7	50	esp. 4°C-4h	30	9.67	10.33	3.056	54.85
	2	27	9	14	50		30	9.67	10.33		
	3	30	10	10	50		30	9.67	10.33		

Lordelo	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-24h	1	33	10	7	50	esp.4°C-24h	33.67	9.33	7	.591	96.40
	2	34	10	6	50		33.67	9.33	7		
	3	34	8	8	50		33.67	9.33	7		

Padrela	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-1h	1	35	9	6	50	esp. 4°C-1h	33	8	9	2.548	63.61
	2	31	9	10	50		33	8	9		
	3	33	6	11	50		33	8	9		

Padreia	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-4h	1	37	6	7	50	esp. 4°C-4h	32.33	7.67	10	6.188	18.55
	2	28	7	15	50		32.33	7.67	10		
	3	32	10	8	50		32.33	7.67	10		

Padreia	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-24h	1	40	9	1	50	esp. 4°C-24h	37.33	8.67	4	3.916	41.75
	2	35	9	6	50		37.33	8.67	4		
	3	37	8	5	50		37.33	8.67	4		

Rapid	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-1h	1	29	9	12	50	esp. 4°C-1h	27.67	11	11.33	1.677	79.49
	2	28	10	12	50		27.67	11	11.33		
	3	26	14	10	50		27.67	11	11.33		

Rapid	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-4h	1	33	6	11	50	esp. 4°C-4h	29.33	9.33	11.33	3.759	43.96
	2	28	9	13	50		29.33	9.33	11.33		
	3	27	13	10	50		29.33	9.33	11.33		

Rapid	rep	padrão de MT			Total		MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2
Modalidade		MO	PO	MD+PD							
4°C-24h	1	34	6	10	50	esp. 4°C-24h	29	9.33	11.67	3.71	44.66
	2	27	10	13	50		29	9.33	11.67		
	3	26	12	12	50		29	9.33	11.67		

A II.4 Teste de χ^2 - Análise da homogeneidade a 4°C (1 hora -4horas -24horas).

D. nowe	rep	padrão de MT			Total	esperados	MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2		
Modalidade		MO	PO	MD+PD									
4°C-1h	1	90	36	24	150		92.67	31.67	25.67			1.864	70.07
4°C-4h	2	91	30	29	150		92.67	31.67	25.67				
4°C-24h	3	97	29	24	150	92.67	31.67	25.67					

Gambit	rep	padrão de MT			Total	esperados	MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2		
Modalidade		MO	PO	MD+PD									
4°C-1h	1	92	25	33	150		102.67	19.67	27.67			10.39	3.44
4°C-4h	2	99	21	30	150		102.67	19.67	27.67				
4°C-24h	3	117	13	20	150	102.67	19.67	27.67					

Lordelo	rep	padrão de MT			Total	esperados	MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2		
Modalidade		MO	PO	MD+PD									
4°C-1h	1	99	22	29	150		96.67	26.33	27			3.873	42.35
4°C-4h	2	90	29	31	150		96.67	26.33	27				
4°C-24h	3	101	28	21	150	96.67	26.33	27					

Padrela	rep	padrão de MT			Total	esperados	MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2		
Modalidade		MO	PO	MD+PD									
4°C-1h	1	99	24	27	150		102.67	24.33	23			9.571	4.83
4°C-4h	2	97	23	30	150		102.67	24.33	23				
4°C-24h	3	112	26	12	150	102.67	24.33	23					

Rapid	rep	padrão de MT			Total	esperados	MO	PO	MD+PD	χ^2	Prob χ^2		
Modalidade		MO	PO	MD+PD									
4°C-1h	1	83	33	34	150		86	29.67	34.33			0.744	94.58
4°C-4h	2	88	28	34	150		86	29.67	34.33				
4°C-24h	3	87	28	35	150	86	29.67	34.33					

ANEXO III

A III. Teste de χ^2 - Avaliação da homogeneidade intervarieta.

A III. 1 - Teste de χ^2 - Avaliação da homogeneidade intervarieta a 20°C

	20 °C			total
	MO	PO	MD+PD	
Dank nowe	124	18	8	150
Gambit	130	5	15	150
Lordelo	130	14	6	150
Padrela	123	14	13	150
Rapid	126	12	12	150
	633	63	54	750
esperados	126,6	12,6	10,8	150
	126,6	12,6	10,8	
	126,6	12,6	10,8	
	126,6	12,6	10,8	
	126,6	12,6	10,8	
$\chi^2 = 22,618$ Prob $\chi^2 = 0,1243$				

A III. 2 - Teste de χ^2 - Avaliação da homogeneidade intervarieta a 8°C

	8 °C						
	1 h		4 h		24 h		total
	MO	outros	MO	outros	MO	outros	
Padrela	36	14	33	17	41	9	150
Lordelo	38	12	38	12	34	16	150
Dank nowe	36	14	44	6	37	13	150
Gambit	35	15	37	13	41	9	150
Rapid	37	13	36	14	36	14	150
Total	182	68	188	62	189	61	750
esperados	36,4	13,6	37,6	12,4	37,8	12,2	
	36,4	13,6	37,6	12,4	37,8	12,2	
	36,4	13,6	37,6	12,4	37,8	12,2	
	36,4	13,6	37,6	12,4	37,8	12,2	
	36,4	13,6	37,6	12,4	37,8	12,2	
Total							$\chi^2 = 11,724$ Prob. $\chi^2 = 0,925$
(8°C-1h)							$\chi^2 = 0,525$ Prob. $\chi^2 = 0,971$
(8°C-4h)							$\chi^2 = 6,992$ Prob. $\chi^2 = 0,136$
(8°C-24h)							$\chi^2 = 4,207$ Prob. $\chi^2 = 0,379$

A III . 3- Teste de χ^2 - Avaliação da homogeneidade intervarietal a 4°C

	4°C										
	1 h				4 h			24 h			Total
	MO	PO	MD	PD	MO	PO	MD+PD	MO	PO	MD+PD	
D. nowe	93	36	16	5	91	31	28	97	29	24	450
Gambit	92	25	19	14	99	21	30	117	13	20	450
Lordelo	99	22	17	12	90	29	31	101	28	21	450
Padrela	99	24	17	10	97	23	30	112	26	12	450
Rapid	83	33	27	7	88	28	34	87	28	35	450
	466	140	96	48	465	132	153	514	124	112	2250
esperados	93,2	28	19,2	9,6	93	26,4	30,6	102,8	24,8	22,4	
	93,2	28	19,2	9,6	93	26,4	30,6	102,8	24,8	22,4	
	93,2	28	19,2	9,6	93	26,4	30,6	102,8	24,8	22,4	
	93,2	28	19,2	9,6	93	26,4	30,6	102,8	24,8	22,4	
	93,2	28	19,2	9,6	93	26,4	30,6	102,8	24,8	22,4	
4°C $\chi^2 = 46,41$ Prob χ^2 0,1146											
4°C-1h $\chi^2 = 16,9612$ Prob χ^2 0,1511											
4°C-4h $\chi^2 = 4,2922$ Prob χ^2 0,8298											
4°C-24h $\chi^2 = 25,1569$ Prob χ^2 0,0015											

A III . 4 - Teste de χ^2 - Avaliação da homogeneidade intervarietal a 4°C- 24 horas.
Contribuição de cada variedade para o valor final.

	4°C-24 h				g.l.	χ^2	Prob. χ^2
	MO	PO	MD+PD	Total			
Dank nowe	97	29	24	150	2	1,1528	
Gambit	117	13	20	150	2	7,8331	
Lordelo	101	28	21	150	2	0,5319	
Padrela	112	26	12	150	2	5,7100	
Rapid	87	28	35	150	2	9,9288	
Total	514	124	112	750	8	25,1566	0,0015
esperados	102,8	24,8	22,4	150			
	102,8	24,8	22,4	150			
	102,8	24,8	22,4	150			
	102,8	24,8	22,4	150			
	102,8	24,8	22,4	150			

A III . 5- Teste de χ^2 - Avaliação do efeito da temperatura na organização dos MTs a 20°C, 8°C e 4°C

Dank nowe	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	124	18	8	150
8°C	117	23	10	150
4°C	278	95	77	450
total	519	136	95	750
Esperados	103,8	27,2	19	
	103,8	27,2	19	
	311,4	81,6	57	
				Prob χ^2 = 1E-06
				χ^2 = 32,462

Lordelo	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	130	14	6	150
8°C	110	21	19	150
4°C	290	79	81	450
total	530	114	106	750
Esperados	106	22,8	21,2	
	106	22,8	21,2	
	318	68,4	63,6	
				Prob χ^2 = 7E-06
				χ^2 = 29,109

Gambit	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	130	5	15	150
8°C	113	15	22	150
4°C-1h	92	25	33	150
total	335	45	70	450
Esperados	111,7	15	23,33	
	111,7	15	23,33	
	111,7	15	23,33	
			Prob $\chi^2 =$	2E-05
			$\chi^2 =$	26,878

Gambit	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	130	5	15	150
8°C	113	15	22	150
4°C-4h	99	21	30	150
total	342	41	67	450
Esperados	114	13,67	22,333	
	114	13,67	22,333	
	114	13,67	22,333	
			Prob $\chi^2 =$	0,00085
			$\chi^2 =$	18,8332

Gambit	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	130	5	15	150
8°C	113	15	22	150
4°C-24h	117	13	20	150
total	360	33	57	450
Esperados	120	11	19	
	120	11	19	
	120	11	19	
			Prob $\chi^2 =$	0,1001
			$\chi^2 =$	7,776

Rapid	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	126	12	12	150
8°C	109	23	18	150
4°C	258	89	103	450
total	493	124	133	750
Esperados	98,6	24,8	26,6	
	98,6	24,8	26,6	
	295,8	74,4	79,8	
			Prob $\chi^2 =$	3E-08
			$\chi^2 =$	50000

Padrela	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	123	14	13	150
8°C	110	21	19	150
4°C-1h	99	24	27	150
total	332	59	59	450
Esperados	110,7	19,67	19,67	
	110,7	19,67	19,67	
	110,7	19,67	19,67	
			Prob $\chi^2 =$	0,0356
			$\chi^2 =$	10,303

Padrela	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	123	14	13	150
8°C	110	21	19	150
4°C-4h	97	23	30	150
total	330	58	62	450
Esperados	110	19,33	20,667	
	110	19,33	20,667	
	110	19,33	20,667	
			Prob $\chi^2 =$	0,01354
			$\chi^2 =$	12,5766

Padrela	padrão de Mt			
Modalidade	MO	PO	MD+PD	total
20°C	123	14	13	150
8°C	110	21	19	150
4°C-24h	112	26	12	150
total	345	61	44	450
Esperados	115	20,333	14,667	
	115	20,333	14,667	
	115	20,333	14,667	
			Prob $\chi^2 =$	0,1725
			$\chi^2 =$	6,3805

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

NATIONAL TECHNICAL INFORMATION SERVICE
(NTIS)

Reproduction Release Rights for Copyrighted and Proprietary Rights Material

Document Identification

Title: _____

Author(s): _____

Date: _____

Reproduction Release

"I hereby grant to the National Technical Information Service nonexclusive permission to reproduce and sell this copyrighted work. Permission for further reproduction must be obtained from the copyright owner."

Signature: _____

Printed Name: _____

Organization: _____

Position: _____

Address: _____

Zip Code: _____ Telephone No.: _____

If reproduction release is granted

Documents announced in the GRAI and the Abstract Newsletter are usually made available to users in paper copy and microfiche. If permission is granted to reproduce and sell the document, please CHECK ONE of the options below and sign the release.

Paper copy and Microfiche reproduction

Paper copy reproduction only

Microfiche reproduction only

(over)

Document Availability Information:

If permission to reproduce is not granted to NTIS, but, if you wish NTIS to announce and cite the availability of the document from another source, please provide the following information regarding the availability of the document. (NTIS will not announce a document unless it is publicly available and a dependable source can be specified. Contributors should also be aware that NTIS selection criteria are significantly more stringent for documents which cannot be made available through NTIS.)

Publisher/Distributor:

Address:

Price per copy:

TÍTULO:

ABSTRACT

Espaço:1 1/2

Nº de palavras:máximo 200 palavras

Margens: 2,5 cm para cada lado

NOME
DEPARTAMENTO /GRUPO DE DISCIPLINAS
CURSO DE MESTRADO
ORIENTADOR
DATA
TÍTULO

RESUMO:

Espaço:1 1/2

Nº de palavras:máximo 200 palavras

Margens: 2,5 cm para cada lado

TÍTULO:

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the resistance of the cortical microtubules to cold in different varieties and populations of rye (*Secale cereale* L.). In order to accomplish that, two varieties of seeds native to Germany, one variety of seeds native to Poland and seeds of two Portuguese populations were incubated at 20°C, 8°C (1h, 4h and 24h) and 4°C (1h, 4h and 24h) and using the indirect immunofluorescence technique the pattern of cortical microtubules was assessed.

The homogeneity of the intervarietal behaviour in the 20°C, 8°C and 4°C (1h and 4h) treatments was observed. However, in the 4°C-24h treatment the behaviour among the varieties and/or populations varied significantly.

The comparison of the cortical microtubules pattern and the root growth showed a correlation between the two parameters. The varieties showing a low root growth at 4°C did not show cortical microtubules resistant to cold after 24h at 4°C; while both the populations and the varieties which showed a superior root growth at low temperatures or curves of root growth similar at 8°C and at 4°C showed microtubules which were resistant to cold after 24h at 4°C.

Key words: Cortical microtubules; Sensibility to cold; Genetic variability; *Secale cereale*; Root growth; Immunofluorescence.

NOME
DEPARTAMENTO /GRUPO DE DISCIPLINAS
CURSO DE MESTRADO
ORIENTADOR
DATA
TÍTULO

RESUMO:

Neste trabalho procurou-se avaliar a resistência ao frio dos microtúbulos corticais em diferentes variedades e populações de centeio (*Secale cereale* L.). Para tal as sementes de duas variedades oriundas da Alemanha, uma oriunda da Polónia e duas populações regionais de Portugal foram incubadas a 20°C, 8°C (1h, 4h e 24h) e 4°C (1h, 4h, 24h) e pela técnica de imunofluorescência foi visualizado o padrão de microtúbulos corticais.

Verificou-se homogeneidade de comportamento intervarietal nas modalidades de 20°C e 8°C e 4°C (1h e 4h), mas na modalidade de 4°C-24h o comportamento entre as variedades e/ou populações diferia significativamente entre si.

A comparação do padrão de microtúbulos corticais e o comportamento morfológico em termos de crescimento radicular revelou existir correlação entre os dois parâmetros. Variedades com baixo crescimento radicular a 4°C não apresentavam microtúbulos resistentes ao frio no final de 24h a 4°C, enquanto as populações e variedades que apresentavam maior crescimento radicular a baixas temperaturas ou curvas de crescimento radicular semelhantes a 8°C e 4°C apresentavam microtúbulos resistentes ao frio no final de 24h a 4°C.

Palavras chave: Microtúbulos corticais; Sensibilidade ao frio; variabilidade genética; *Secale cereale*; Crescimento radicular; Imunofluorescência.