

1 Identificação da proposta

Dinâmica das respostas celulares envolvidas no desenvolvimento anatômico de galhas de
Psidium cattleianum (Myrtaceae)

Equipe técnica:

Prof. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias (Departamento de Botânica UFMG)
Renê Gonçalves da Silva Carneiro, MSc (Doutorando - PPG Biologia Vegetal UFMG)
Prof. Dr. Claudio Luis Donnici (Departamento de Química – ICEX UFMG)
Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira (INBIO – UFU)
Dra Dalva Luiz de Queiroz (EMBRAPA Colombo)

2 Qualificação do principal problema a ser abordado

As Myrtaceae são amplamente registradas como hospedeiras de herbívoros galhadores na região neotropical. Não obstante, estudos estruturais e químicos em plantas hospedeiras de galhas nesta família são escassos quando comparados a outras famílias botânicas. Tendo em vista sua capacidade de atrair e abrigar os herbívoros galhadores, permitindo a morfogênese constante e repetitiva de diversos morfotipos de galhas, justifica-se a escolha de uma Myrtaceae como espécie-modelo para estudos de desenvolvimento e de acúmulo de reservas em sistemas galhador-plantas hospedeiras.

Galhas entomógenas constituem microlaboratórios que permitem a avaliação de diversos aspectos estruturais e químicos em um sistema finamente regulado pelo galhador. As galhas de *Psidium cattleianum* são induzidas por uma espécie recentemente determinada, *Nothotrioza cattleiani* Burckhardt (Hemiptera: Psylloidea) (Carneiro et al. 2013), o qual se alimenta inserindo o aparelho bucal pungitivo diretamente no floema dos feixes vasculares. Nessa relação, as investigações propostas se tornam interessantes pela possibilidade de elucidar eventos-chave que determinam respostas morfogênicas específicas, fruto da manipulação dos tecidos hospedeiros em benefício do galhador parasita.

Sob essa perspectiva, as seguintes hipóteses foram elaboradas:

- 1- Muito embora, o padrão de desenvolvimento das galhas seja determinado por modificações dependentes do táxon indutor (*sensu* Rohfritsch 1992), o metabolismo intrínseco da planta hospedeira determina padrões repetitivos de respostas celulares.
- 2- A formação da galha promove alterações no padrão de diferenciação, expansão e divisão celulares, esperando-se mudanças na composição e padrão de deposição da matriz da parede celular, bem como da organização dos polímeros do citoesqueleto nas galhas em relação ao tecido não galhado.

- 3- As Myrtaceae apresentam potencial para produção de lipídios tóxicos e antiherbivóricos, logo se espera que, em virtude do estabelecimento do campo cecidogênico, haja bloqueio na produção ou neutralização de tais substâncias, como observado por Moura et al. (2009), de modo que estas não prejudiquem a instalação e o ciclo de vida dos indutores.
- 4- O acúmulo e metabolismo de carboidratos têm sido estudados em galhas induzidas por sugadores (Oliveira & Isaias 2010b; Oliveira et al. 2010). Em espécies de plantas hospedeiras pertencentes à família Myrtaceae, reconhecidamente produtoras de substâncias lipídicas, espera-se detectar atividade enzimática capaz de potencializar tais substâncias como nutricionais para os galhadores, convergindo as reservas para o metabolismo dos açúcares.

A presente proposta incorporará identificação de moléculas, via análises microquímicas, a localização de substâncias nos tecidos das galhas, via histoquímica, o que dará precisão às discussões sobre as funções das substâncias em galhas - nutrição ou defesa. Ainda, incorporará análises sobre o papel da parede celular e dos microtúbulos na determinação do morfotipo das galhas, além de análises microquímicas que, aliadas às análises histoquímicas, permitirão identificar a localização e a função das moléculas nas diferentes camadas de tecidos das galhas.

3 Objetivos e metas a serem alcançados

Objetivo geral

Determinar as alterações citológicas e químicas que se relacionam ao estabelecimento do galhador e revelam o status metabólico/fisiológico dos tecidos rediferenciados durante a morfogênese de galhas induzidas por *Nothotrioza cattleiani* em *Psidium cattleianum*. Essas análises permitirão observar a extensão do impacto exercido por galhadores sugadores na determinação de processos morfogênicos específicos.

Objetivos específicos

1. Estudar o desenvolvimento anatômico de galhas induzidas por *Nothotrioza cattleiani* em *Psidium cattleianum*, com ênfase na histometria e nos padrões de alteração nos eixos de alongamento e expansão celulares, verificando a existência de padrões estruturais.
2. Avaliar a citologia e a histoquímica das galhas de *Psidium cattleianum* de modo a averiguar a formação de gradientes citológicos e histoquímicos como padrão,

independentemente do taxa indutor, testando a hipótese proposta por Oliveira & Isaias (2010b) e Oliveira et al. (2010).

3. Detectar, por técnicas de imunocitoquímica e de espectrometria na região do infravermelho, alterações de parede celular relacionadas às alterações de forma e de função das distintas zonas de tecido das galhas de *Psidium cattleianum*.
4. Detectar, através de técnicas de histoquímica e microquímica, perfis químicos de substâncias lipídicas ligadas a nutrição ou defesa em galhas de *Psidium cattleianum* visando detectar limites impostos pelo metabolismo da planta hospedeira e a capacidade dos indutores em manipular tal metabolismo, testando a hipótese proposta por Moura et al. (2009).
5. Localizar histoquimicamente a atividade de enzimas ligadas ao metabolismo de lipídios e carboidratos como forma de elucidar as vias metabólicas pelas quais as substâncias potencialmente armazenadas por *Psidium cattleianum* podem ser aproveitadas tanto pela maquinaria celular vegetal quanto pelos indutores em sua alimentação.

4 Metodologia a ser empregada

Coleta de material

As amostras consistirão de folhas não galhadas jovens e totalmente expandidas e de galhas em diferentes estágios de desenvolvimento (crescimento, maturação e senescência) no sistema *Nothotrioza cattleiani* (Hemiptera: Psylloidea) - *Psidium cattleianum* (Myrtaceae), coletadas na região do Parque Estadual do Marumbi, Paraná, Brasil.

Análises estruturais e histométricas

Para a preparação de lâminas permanentes, as amostras ($n \geq 5$) serão desidratadas em série butílica (Johansen 1940) e incluídas em Paraplast® (Kraus & Arduin 1997). Cortes transversais (10-14 μm) serão obtidos em micrótomo rotatório (Leica® 2035 BIOCUT). Os cortes histológicos serão afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing 1974). Após a retirada do Paraplast® com acetato de butila a 56°C, em banho-maria, as amostras serão desidratadas em série etílica e coradas com a mistura de azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%) e montadas em verniz vitral incolor Acrilex® (Paiva 2006).

A partir de imagens digitais serão medidas as áreas celulares e os eixos maior e menor da protoderme nas faces adaxial e abaxial, dos meristemas adaxial, mediano e abaxial, bem

como dos tecidos derivados destes quando da formação da galha, com auxílio do programa AxioVision Rel. 4.8.

Análises citológicas

As amostras serão fixadas em Karnovsky 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) por 24 horas (Karnovsky 1965, modificado), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M, desidratadas em série etanólica (Johansen 1940) e infiltradas em Araldite® (Luft 1961). O material será seccionado em Ultramicrótomo Reichert-jung – Ultracut, contrastado em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com Reynolds (1963) e analisado no Microscópio Eletrônico de Transmissão ZEISS EM 109.

Análises histoquímicas

- *Detecção de carboidratos*

Para a detecção de amido, será utilizado o teste de Lugol (Johansen 1940) onde material fresco ou fixado será submetido à reação em solução de iodo-iodeto de potássio por cinco minutos e observado em microscópio ótico. Para açúcares redutores, o teste de Fehling (Sass 1951) será realizado em material fresco imerso em solução composta de parcelas iguais das soluções A (sulfato de cobre II 6,93% m:v) e B (tartarato sódico de potássio 34,6% e hidróxido de sódio 12% m:m:v) e aquecidas à temperatura de pré-ebulição..

- *Detecção de lipídios*

Lipídios totais serão corados com o reagente Vermelho do Sudão (Brundett *et al.* 1991) com material fresco ou fixado imersos por cinco minutos em solução saturada de vermelho B de Sudão em etanol 70°GL. Óleos essenciais serão evidenciados com o reagente de NADI (David & Carde 1964), sendo imersos em solução contendo α -naftol 1%, dimetil-*p*-feniletilenodiamina 1% e tampão fosfato 0,01M pH 7,2 (1:1:98, v/v). Triterpenos serão revelados instantaneamente com o reagente de Lieberman-bouchard (Wagner & Bladt 1996) pela imersão em solução de anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado.

- *Detecção da atividade de lipases*

Como primeiro passo para a quebra das moléculas de lipídios nos sítios de armazenagem, a ação das lipases será verificada em secções à mão livre de material recém-coletado incubadas em solução 0,03M de α -naftilacetato em acetona 1% em tampão fosfato pH 7,0 por 30 minutos a 27°C. Em seguida, será adicionada solução reveladora constituída de 2 partes de solução aquosa de azul rápido B 1% (Fast blue B) e 5 partes de solução aquosa de Dodecil sulfato de sódio 5% (SDS). É esperada uma coloração inicialmente vermelha, que muda para azul quando estabilizada, nos sítios de ação das aliesterases. O controle será feito

incubando-se os cortes em solução 10^{-5} M de cloreto férrico em etapa anterior às descritas acima (van Asperen 1962, modificado).

- *Detecção da atividade da fosfatase ácida*

De modo a verificar a possível liberação de fosfato pelo ácido fosfórico, para a ação da fosforilase nos tecidos sadios e galhas, as amostras serão fixadas em etanol 70%, infiltradas em historresina e seccionadas em micrótomo rotatório (5–10 μ m) (Johansen, 1940). Em seguida, serão incubadas por 30 minutos a 18 horas em 0,6g de nitrato de chumbo em 500 ml de tampão acetato 0,5 M com pH 4,5, adicionado de 50 ml de glicerofosfato de sódio 0,1 M. Posteriormente, as seções serão lavadas em água destilada e colocadas em solução de amônia diluída por 5 minutos, lavadas e montadas para observação ao microscópio de luz.

- *Detecção de atividade da glicose-6-fosfatase*

A glicose-6-fosfatase está relacionada com a síntese de glicose 6-fosfato que é um intermediário da via glicolítica e da síntese de sacarose. A atividade desta enzima em tecidos sadios e nas galhas pode indicar o hábito alimentar do galhador e formas de armazenagem de nutrientes. Para verificar sua presença nos tecidos galhados em comparação aos sadios, seções de material recém-coletado serão incubadas por 15 minutos a 2 horas à 37 °C em 20 mg de potássio glicose-6-fosfato, 125 ml de tampão tris-maleato 0,2 M com pH 6,7, 3 ml de solução nitrato de chumbo 2%, e 7 ml de água destilada. Em seguida, o material será lavado em água destilada, submetido à solução de sulfato de amônia por 5 minutos e montado em gelatina glicerinada (Jensen 1962).

- *Detecção de atividade da fosforilase*

A atividade da fosforilase poderá fornecer evidências da síntese de amido para nutrição do galhador ou manutenção do metabolismo da galha. A atividade desta enzima será verificada em seções de tecidos recém-coletados e incubados em glicose-1-fosfato 1% em tampão acetato (pH 6,0) por 2 horas a temperatura ambiente, submetidas a solução de iodeto de potássio iodado (reagente de Lugol) para verificar a presença de amido recém-formado. Para controle será usado um inibidor da fosfatase (Jensen 1962).

- *Detecção de atividade da sacarose sintase*

De modo a verificar comparativamente a presença de subprodutos da quebra e síntese de sacarose, que estão relacionados diretamente com a síntese de amido e transporte de fotoassimilados, a atividade da sacarose sintase *in situ* será evidenciada nas amostras. Estas serão fixadas e tratadas com sacarose e UDP (uridina di-fosfato) para iniciar a cascata de reações da enzima culminando na formação de sais. Os tecidos serão fixados em formaldeído 2%, polivinilpirrolidona 2% e ditiotreitól 5mM por 1 hora. As amostras serão lavadas em água

oito vezes durante 1 hora. Para detecção dos sítios de formação da enzima, as seções serão incubadas em meio contendo 100 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,2% BSA, 1mM NAD, 0,02 mM glicose-1,6-bifosfato, 1 U fosfoglicomutase, 1 U glicose-6-fosfato desidrogenase, 1 U UDP glicose pirofosforilase, 0,03% NBT, 50 mM sacarose, 1 mM UDP, 1 mM PPi. A atividade da enzima *in situ* será demonstrada pela formação de um composto de NADH com azul nitroso de tetrazólio (NTB). O controle será feito pela supressão da sacarose (Wittich & Vreugdenhil 1998).

- *Detecção de atividade das invertases*

A atividade da invertase disponibiliza glicose a partir da quebra da sacarose para as atividades metabólicas e/ou alimentação do galhador. Os sítios de atividade da invertase nas amostras serão localizados em seções de material recém-coletado, fixado em formalina 4% (pH 7,0) por 30 minutos. As seções serão lavadas em água destilada dez vezes por três a cinco horas para remover todos os açúcares solúveis. Em seguida, as seções serão incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente em reagente contendo fosfato de sódio 0,38 M (pH 6,0), 0,24 mg ml⁻¹ de azul nitroso de tetrazólio, 0,14mg ml⁻¹ de metassulfato de fenazina, 25 unidades ml⁻¹ de glicose oxidase e 5mg ml⁻¹ de sacarose-1. Para controle, as seções serão incubadas em reagente sem sacarose. Depois de lavadas em água, as seções serão fixadas em formalina por 15 minutos, seguido por várias passagens em água, montadas e fotografadas (Doehlert & Felker 1987).

Análises de imunocitoquímica

- *Localização de FBPase*

A localização da frutose 1,6 bisfosfatase (FBPase) será feita de acordo com o método descrito por Schmoll et al. 1995 através da utilização de um anticorpo anti FBPase seguido de um anticorpo secundário e análise em microscópio de epifluorescência.

- *Compostos de parede*

Para detecção da composição da parede celular, as amostras serão fixadas em Karnovsky 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (Karnovsky 1965, modificado), desidratadas em série etanólica (20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), e infiltradas em historresina. Seções transversais serão feitas em micrótomo rotatório (Jung biocut), incubadas em anticorpos monoclonais (MAbs) JIM5, JIM7, JIM13, LM5 e LM6 (solicitados no Centre for Plant Science, University of Leeds, UK), epitopos descritos na tabela 1. A incubação das seções para imunofluorescência será processada segundo Mastroberti & Mariath (2008) e as lâminas serão analisadas em microscópio de epifluorescência.

- *Visualização dos microtúbulos*

A orientação dos microtúbulos serão marcados com anticorpos monoclonais como descrito por Sugimoto *et al.* (2000). As amostras serão fixadas em formaldeído 1,5% e glutaraldeído 0,5% em tampão PEMT, lavados e incubados em anticorpos primários anti-tubulina por 12 horas em temperatura ambiente. Em seguida serão incubados em anticorpos secundários por 3 horas a 37°C, montados em lâminas e analisados em microscópio de epifluorescência.

Tabela 1. Descrição e reconhecimento dos anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais	Epitopos	Referências
JIM 5	Homogalacturananos (HGA) não metil-esterificados	VandenBosh <i>et al.</i> (1989), Knox <i>et al.</i> (1990), Willats <i>et al.</i> (2001), Clausen <i>et al.</i> 2003)
JIM 7	HGA metil-esterificado	Knox <i>et al.</i> (1990), Willats <i>et al.</i> (2001), Clausen <i>et al.</i> 2003)
JIM 13	Proteínas arabinogalactanos	Knox <i>et al.</i> (1991)
LM 5	(1→4) β-D-galactano	Jones <i>et al.</i> (1997)
LM 6	(1 → 5) α-L-arabinanos	Willats <i>et al.</i> (1998)

Análises microquímicas

A análise dos perfis químicos de tecidos não galhados e de galhas será feita através de cromatografia de fase gasosa a partir de extratos etanólicos. Frações adicionadas a diferentes solventes serão injetadas em espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo de fase gasosa (CG-EM ou GC-MS) equipado com coluna capilar ou com espectrômetro de massas com ionização tipo electrospray (ESI-MS). A identificação dos sinais será feita por comparação entre os espectros obtidos e as bibliotecas pré-existentes ou por análise direta dos padrões de fragmentação.

A análise do grau de esterificação das pectinas será estimada nos diferentes tratamentos (n≥5) através do uso de espectrômetro na faixa do infravermelho e análise comparativa das bandas na região característica de 1750 cm⁻¹.

5 Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta

Ao final do presente projeto, esperam-se dados que permitam a publicação de pelo menos 5 artigos, divulgados na forma de apresentação de trabalhos e publicação de pelo menos 5 resumos em eventos nacionais e internacionais, com as abordagens assim propostas:

1. Desenvolvimento anatômico de galhas induzidas por *Nothotrioza cattleiani* em *Psidium cattleianum*, com ênfase na histometria e nos padrões de alteração nos eixos de alongamento e expansão celulares que determinam os morfotipos de galhas.
2. Detecção de gradientes citológicos e histoquímicos ligados ao campo cecidogênico induzidos por insetos sugadores em *Psidium cattleianum*.
3. Detecção imunocitoquímica e por análises do espectro na região do infravermelho das alterações em nível de parede celular necessárias às mudanças de forma e de função das distintas zonas de tecido das galhas de *Psidium cattleianum*.
4. Perfis químicos de substâncias lipídicas ligadas a nutrição ou defesa em galhas de *Psidium cattleianum*, aliando análises histoquímicas a microquímicas, visando detectar limites impostos pelo metabolismo da planta hospedeira e a capacidade dos indutores em manipular tal metabolismo.
5. Atividade enzimática em galhas como forma de elucidar as vias metabólicas pelas quais as substâncias potencialmente armazenadas por *Psidium cattleianum* podem ser aproveitadas tanto pela maquinaria celular vegetal quanto pelos indutores em sua alimentação.

As publicações configurarão uma tese de doutorado e a iniciação científica de um graduando.

6 Cronograma

	Ano 1				Ano 2				Ano 3			
<i>Atividades / trimestre</i>	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta de Material	X		X		X		X		X		X	
Análises anatômicas	X	X	X	X	X	X						
Análises histoquímicas			X	X			X	X				
Análises citológicas				X	X	X	X	X	X			
Análises Imunocitoquímicas				X	X	X	X	X	X			
Análises químicas		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Redação de relatório										X	X	X
Redação de artigos					X	X	X	X	X	X	X	X

7 Referências bibliográficas

- Bissing DR (1974) Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Technology*, 49: 116-117.
- Brundett MC, Kendrick B & Peterson CA (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, 66: 111-116.
- Bukatsch F (1972) Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61:255.
- Carneiro, R.G.S., Burckhardt, D., Isaias, R.M.S., 2013. Biology and systematics of gall-inducing triozids (Hemiptera: Psylloidea) associated with *Psidium* spp. (Myrtaceae). *Zootaxa* 3620 (1): 129–146.
- Clausen MH, Willats WGT & Knox JP (2003) Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of antihomogalacturonan monoclonal antibodies LM5, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research* 338:1797-1800.
- David R & Carde JP (1964) Coloration defférentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 258: 1338-1340.
- Doehlert DC & Felker FC (1987) Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. *Physiologia Plantarum* 70:51-57.
- Jensen WA (1962) Botanical histochemistry. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- Jones L, Seymour GB & Knox JP (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4) β -D-galactan. *Plant Physiology* 113:1405-1412.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138.
- Knox JP, Linstead PJ, King J, Cooper C & Roberts K (1990) Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of roots apices. *Planta* 181:512-521.
- Knox JP, Linstead PJ, Peart J, Cooper C & Roberts K (1991) Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant Journal* 1:317-326.
- Kraus JE & Arduin M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica RJ, EDUR.
- Luft JH (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *The journal of biophysical and biochemical cytology* 9: 404-414.

- Mastroberti AA & Mariath JEA. 2008. Immunocytochemistry of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). *Revista Brasileira Botânica* 31:1-13.
- Moura MZD, Soares GLG & Isaias RMS (2009) Intra-specific phenotypic variations in *Lantana camara* leaves affect host selection by the gall maker *Aceria lantanae*. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 541–548.
- Oliveira DC & Isaias RMS (2010b) Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Science*, 178(4):350-358
- Oliveira DC, Magalhães TA, Carneiro RGS, Alvim MN & Isaias RMS (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns?. *Protoplasma*, 242(1-4):81-93.
- Paiva JGA (2006) Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica*, 20(2): 257-264.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212.
- Rohfritsch O (1992) Patterns in gall development. In: Shorthouse JD Rohfritsch O (eds) *Biology of insect induced galls*. Oxford University, Oxford, pp 60-86.
- Sass JE (1951) *Botanical Microtechnique*. 2ª ed. Ames: Iowa State College Press.
- Sugimoto K, Williamson RE & Wasteneys GO (2000) New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1493-1506.
- Van Asperen K (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol.*, 8: 401-416.
- VandenBosh KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW & Brewin N (1989) Common components of the infection thread matrix and intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO Journal* 8:335-342.
- Wagner H & Blatt S, (1996) *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*, second ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Willats WGA, Marcus SE & Knox JP (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1-5)- α -L-arabinan. *Carbohydrate Research* 308:149-152.
- Willats WGT, McCartney L, Mackie L & Knox P (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular Biology* 47:9-27.
- Wittich PE. & Vreugdenhil D (1998) Localization of sucrose synthase in developing maize kernels by in situ enzyme histochemistry. *Journal Experimental Botany* 49:163-1171.