

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARIA IZABEL GALLÃO

"ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS
POR HIDROLISADOS DE QUITINA EM CÉLULAS DE *Saccharum
officinarum* L. E *Citrus aurantium* L. CULTIVADAS EM
SUSPENSÃO"

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Maria Izabel Gallão
e aprovada pela Comissão Julgadora.

10/04/2000

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia
Celular

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
9135a
 V. Es.
 TOMBO BC/ 41444
 PROC. 278/00
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 11-07-00
 N.º CPD

CM-00142420-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Gallão, Maria Izabel

G135a Alterações morfológicas e bioquímicas induzidas por hidrolisado de quitina em células de *Sacharum officinarum* L.E. *Citrus aurantium* L. cultivadas em suspensão/Maria Izabel Gallão. - - Campinas, SP[s.n.], 2000.
 118f.ilus.

Orientador: Angelo Luiz Cortelazzo
 Tese(Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

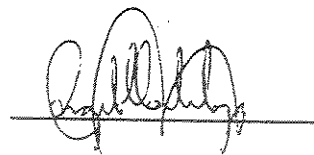
1. Cana-de-açúcar. 2. Laranja. 3. Quitina. I. Cortelazzo, Angelo Luiz.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 10/04/2000

Banca Examinadora

Titulares:

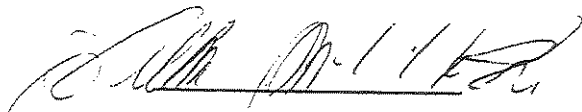
Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo



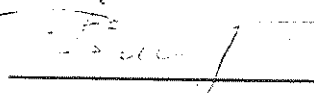
Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder



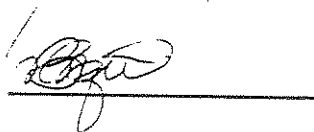
Profa. Dra. Tullia Maria Clara Caterina Filisetti



Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge



Profa. Dra. Cristiana de Noronha Begnani



Suplentes:

Profa. Dra. Telma Regina Gabriel da Silva



Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro



Ao Edy e Pedro Ivo pelo amor,
carinho e paciência que tiveram
durante todo o período desse
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, que com sua compreensão, paciência e orientação tornou possível a realização deste trabalho. Desde o início foi amigo e padrinho nos momentos mais difíceis e felizes.

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pela correção da redação preliminar, principalmente do inglês, sugestões e críticas apresentadas a este trabalho, e pela amizade desde o tempo do mestrado.

Profa. Dra. Cristiana de Noronha Begnani, pela correção da redação preliminar, sugestões e críticas apresentadas a este trabalho, pela amizade e apoio durante esse período.

Profa. Dra. Tullia Filisetti, pela correção da redação preliminar, sugestões e críticas apresentadas a este trabalho.

Prof. Dr. Marcos Buckeridge, pela correção da redação preliminar, sugestões e críticas apresentadas a este trabalho.

Prof. Dr. Manuel Pedro Fevereiro, pelo apoio durante o estágio em seu laboratório em Portugal.

Prof. Edy Sousa de Brito, pelas sugestões e participação em algumas metodologias desenvolvidas nesse trabalho.

A CAPES/PICDT pela concessão da bolsa de estudo durante a participação desse estudo e pelo período de estágio em Portugal

Ao meu Pai e Nilson com todo amor e carinho, apesar de não estarem pessoalmente ao meu lado, estarão muito felizes por eu ter concluído mais essa etapa na minha vida.

A minha mãe Dirce, Valéria, Magda, Eduardo, Máximo e Junior pelo carinho e paciência, mesmo estando, atualmente, tão ausente de suas vidas, sempre estarão torcendo por mim.

Ao Sr. Brito, D. Lea e Marcelo, pelo carinho e compreensão que tiveram nesse período pela ajuda quando nasceu nosso filho, Pedro Ivo.

À Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

À CAPES, que possibilitou através do Programa PICDT apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Biologia Molecular/UFPB, José Antonio, Cecília, Edilva, Graça e Laly que me substituíram e me apoiaram durante meu afastamento, tornando possível a realização desse trabalho.

Aos meus sempre amigos, Fernando e Judite, Denise, Regina, Maristela e José Lino pelo carinho desde muito tempo.

Aos amigos novos e antigos, funcionários, principalmente a Lilian pela paciência, e professores do Departamento de Biologia Celular da Unicamp.

Às técnicas do Centro de Microscopia Eletrônica/IB/Unicamp pela ajuda no Microscópio Eletrônico.

À Coopersucar, em particular a bióloga Daniela e o Dr. Eugênio, por terem cedido os calos de cana.

Ao Oirton por ter cedido a quitina.

ÍNDICE

1. Resumo.....	01
2. Abstract.....	03
3. Introdução.....	05
4. Trabalho submetido à publicação: "Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase elicitation by chitin oligosaccharides in isolated <u>Citrus aurantium</u> L. cells."	15
5. Trabalho a ser submetido à publicação: "Alterações morfológicas em células de <u>Citrus aurantium</u> L. cultivadas em suspensão e submetidas a hidrolisados de quitina."	34
6. Trabalho submetido à publicação: "Biochemical responses to chitin in suspension-cultured sugarcane cells."	61
7. Trabalho a ser submetido à publicação: "Indução de alterações morfológicas provocadas por hidrolisados de quitina em células de cana-de-açúcar cultivadas em suspensão."	80
8. Conclusões.....	103
9. Referências bibliográficas.....	104

1. RESUMO

As células vegetais possuem a capacidade de responder a fatores bióticos e abióticos. Os mecanismos de defesa dessas células incluem a produção de fitoalexinas, lignina e proteases. Nesses processos existe a participação de várias enzimas, dentre elas as peroxidases (EC 1.11.1.7), que participam de inúmeros processos metabólicos e a fenilalaninamonialase, PAL (EC 4.3.1.5). Além das alterações bioquímicas que podem ser avaliadas quando as células vegetais entram em contato com um eliciador, pode-se também avaliar as alterações morfológicas dessas células. Devido a importância do estudo do mecanismo de defesa das células vegetais, foram utilizadas no presente trabalho células de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) e de *Citrus aurantium* (laranja) cultivadas em suspensão e submetidas ao hidrolisado de quitina. Para serem avaliadas as respostas dessas células frente aos tratamentos, foram medidas as atividades das peroxidases do meio e da PAL no interior do citoplasma. Paralelamente, foram realizadas análises citoquímicas e ultraestruturais dos materiais nos diferentes tempos de incubação utilizados. Nas células de laranja as atividades da PAL e das peroxidases tiveram seu maior aumento após 3 horas de eliciação. Nessa espécie as peroxidases básicas foram induzidas preferencialmente pelos hidrolisados de quitina. As alterações de parede celular foram identificadas através da coloração com o azul de toluidina (AT), onde ocorreu uma diminuição da metacromasia, e através da reação positiva com a floroglucina, identificando a presença de compostos fenólicos. Ultraestruturalmente foram observadas desagregações dos polissacarídeos da parede celular, além da presença de vesículas autofágicas no citoplasma dos

materiais tratados. Nas células de cana a atividade da PAL e das peroxidases foram maiores após 6 horas de eliciação com o hidrolisado de quitina. Ao contrário da laranja, nessa espécie as peroxidases ácidas foram induzidas preferencialmente. O material tratado com 6 horas de eliciação apresentou alterações morfológicas identificadas através da coloração com o AT. Essa espécie apresentou diferença no padrão de coloração com esse corante quando comparado com *C. aurantium*. Como a cana é uma monocotiledônea, a constituição de suas paredes celulares é diferente daquela observada para dicotiledôneas, como é o caso da laranja. Essas células possuem maior quantidade de compostos fenólicos, o que diminui a ligação do corante com as pectinas, apresentando uma coloração menos metacromática com o AT. Essa resposta foi ainda mais acentuada após o tratamento com quitina, o que sugere o aumento de compostos fenólicos, hipótese reforçada pela resposta positiva à reação com a floroglucina. Em termos ultraestruturais essas células apresentaram desagregações dos polissacarídeos da parede celular e foi observada a presença de núcleos com regiões de cromatina mais compactadas e nucléolos em processo de degeneração. As alterações nucleares puderam ser identificadas através da reação de Feulgen, tendo sido observado um aumento significativo da área nuclear das células com 6 horas de eliciação. De acordo com os resultados, pode-se concluir que o hidrolisado de quitina induziu resposta de defesa nas duas espécies estudadas, através da produção de compostos fenólicos, estando envolvidas no processo as peroxidases básicas para a laranja, e peroxidases ácidas para a cana-de-açúcar.

2. ABSTRACT

The plant cells possess the capacity to respond to biotic and abiotic factors. The defense mechanisms of these cells include fitoalexin, lignin and protease production. Several enzymes participate in this process, among them the peroxidases (EC 1.11.1.7), which are involved in countless metabolic processes and the phenylalanine ammonia-lyase, PAL (EC 4.3.1.5). Besides the biochemical aspects, the morphologic alterations can also be appraised for plant cells in contact with an elicitor. Due to the importance of the study of defense mechanisms in plants, cells of *Saccharum officinarum* (sugarcane) and of *Citrus aurantium* (orange) were cultivated in suspension and submitted to chitin hydrolyzate. To appraise the response of these cells to the treatments, the peroxidase activities of the medium and of PAL inside the cytoplasm were measured. In parallel, cytochemical and ultrastructural analyses of the materials with different incubation times were used. In orange cells, PAL and peroxidases had the largest activity increase after 3 hours of elicitation. In the first species the basic peroxidases were preferentially induced by the chitin hydrolyzate. The cell wall alterations were identified with the toluidine blue stain, which showed a decrease in metachromasy. The positive reaction of phloroglucinol, identified the presence of phenolic compounds. Ultrastructurally, the disorganization of cell wall polisaccharide, and the presence of cytoplasmic secretory vesicles were observed in the materials treated. In the sugarcane cells, the activity of PAL and of the peroxidases was highest after 6 hours of elicitation with the chitin hydrolyzate. Unlike the orange cells, in sugarcane the acid peroxidases were preferentially

induced. The material treated with 6 hours of elicitation presented morphologic alterations determined with the use of BT. This species presented a different staining pattern in relation to that of *C. aurantium*. As the sugarcane is a monocotyledon, the constitution of their cell walls is different from that observed for the dicotyledon, as in the case of the orange. These cells possess a larger amount of phenolic compounds, which reduces the pectin stainability, presenting a light metachromatic BT staining. That response was still more accentuated after chitin treatment, which suggests the increase of phenolic compounds, a hypothesis reinforced by the positive answer to the phloroglucinol reaction. Ultrastructurally, these cells presented disorganization of the cell wall polysaccharides while, in the nuclei, more compacted chromatin areas and degenerating nucleoli were observed. The nuclear alterations could be identified with the Feulgen reaction, where a significant increase of the nuclear area was observed in cells with 6 hours of elicitation. In agreement with the results, it can be concluded that the chitin hydrolyzate induces defense responses in the two species studied, through the production of phenolic compounds, and involves the action of basic peroxidases for the orange and acid peroxidases for the sugarcane cells.

3. INTRODUÇÃO

As células vegetais são envolvidas por uma parede celular. Essa estrutura lhes confere forma e proteção e é de importância fundamental em processos biológicos como o crescimento e desenvolvimento da planta, expansão de folhas e adaptação ao meio.

Em plantas superiores são encontrados dois tipos de parede: parede primária e parede secundária. As paredes primárias são produzidas quando as células estão crescendo e desta forma elas podem se alongar e/ou aumentar em tamanho. As paredes secundárias quando presentes não possuem essa capacidade.

As paredes primárias são compostas de diversos polissacarídeos (aproximadamente 90%) e proteínas (10%) que podem ser estruturais ou enzimas (Cassab & Varner 1988). Essas moléculas interagem formando a parede e são suas variações que possibilitam o crescimento da célula (Hayashi 1989). Dentre os polissacarídeos, a celulose ($\pm 30\%$) é o mais conhecido, servindo as vezes para designar, ainda que erroneamente, o nome de parede celulósica para as células vegetais. Outros polímeros, as hemiceluloses ($\pm 30\%$), incluem xiloglicanos (XG), xilanos, glicomananos, galactomananos e mananos, sendo os primeiros normalmente mais abundantes. Finalmente, as pectinas ($\pm 30\%$) também perfazem uma quantidade significativa da matéria seca das paredes. Dentre elas, ramnogalacturonanos I (RGI), arabinanos, galactanos, arabinogalactano I, ramnogalactoronanos II (RGII) (Brett & Waldron 1990).

A celulose é um polímero de D-glicose com ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Essas

cadeias interagem formando longos arranjos cristalinos na forma de microfibrilas, e a estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (Brett & Waldron 1990, Carpita & Gibeaut 1993; Delmer 1995). Na maioria das paredes primárias, os elementos fibrilares de celulose interagem com os xiloglicanos (Hayashi 1989).

Os xiloglicanos compreendem cerca de 20-30% da parede primária de dicotiledôneas. São cadeias lineares de D-glicose $\beta(1\rightarrow4)$ mas, diferentemente da celulose, eles possuem numerosos resíduos de xilose adicionados a ramificações na posição 6 das unidades de glicose (Joseleau & Chambat 1984). Além disso, apresentam com frequência D-galactose e, em alguns casos, L-fucose (Hayashi 1989). Devido ao fato da parede primária conter quantidades em peso aproximadamente iguais de xiloglicanos e celulose, nem todos os xiloglicanos podem estar localizados como uma monocamada de cobertura das microfibrilas celulósicas, estando muitos deles formando uma rede entre as mesmas (Carpita & Gibeaut 1993).

Acredita-se que os xiloglicanos possuem uma importante função em diversos processos associados à expansão das paredes celulares. Foi observado que um nonassacarídeo (XXFG) produzido por celulase a partir de xiloglicanos de *Acer* sp é um potente agente anti-auxina em concentrações de 10^{-9} M (York et al. 1984). Entretanto, o XXFG aplicado em concentrações mais altas (10^{-7} a 10^{-6} M) promove o alongamento de caules, mimetizando o papel das auxinas através da ativação de celulasas da parede de caule de ervilha (McDougall & Fry 1990). Assim, até uma determinada concentração, os oligossacarídeos originados da clivagem de xiloglicanos exerceriam um papel inibitório do alongamento e, a partir dessa concentração, passariam a desempenhar um papel promotor do mesmo desenvolvimento.

Moléculas com o comportamento acima descrito são denominadas genericamente de oligossacarinas, que podem ser carboidratos complexos e capazes de induzir o crescimento e desenvolvimento vegetal a baixas

concentrações. Algumas oligossacarinas tais como oligogalacturonídeos, atuam como eliciadores e estimulam resposta de defesa contra patógenos. O termo eliciador foi originalmente empregado para moléculas e outros estímulos que induzem a síntese e o acúmulo de fitoalexinas, inibidores de proteínas, lignina, peroxidase, lipoxigenase e β -1,3 glicanases (Ryan 1988, Ebel & Cosio 1994); sendo mais modernamente admitido como um grupo de moléculas que estimulam qualquer mecanismo de defesa (Dixon 1986, Ebel 1986, Dixon & Lamb 1990)

A reserva de carboidratos mais comum é o amido intracelular. Em algumas plantas contudo, a reserva é encontrada na parede celular que se apresenta espessada e contendo grande quantidade de hemiceluloses (Fry 1989). Em sementes de plantas não endospermicas, como por exemplo o jatobá, essa reserva é formada basicamente por xiloglicanos (Buckeridge et al. 1997); em sementes de plantas endospermicas, como por exemplo *Sesbania marginata* e *Coffea arabica*, os galactomananos predominam (Buckeridge & Dietrich 1996).

Os polissacarídeos pécticos são classificados em três grandes classes: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos I (RG I) e ramnogalacturonanos II (RG II) (McCann & Roberts 1994, Carpita e Gibeaut 1993). Acredita-se que os polímeros pécticos estejam envolvidos no crescimento das plantas e tem sido demonstrado que o processo de alongamento está relacionado à presença de pectinas altamente metiladas e sua interrupção, à presença de pectinas acídicas (Kim & Carpita 1992, McCann & Roberts 1994)

Baron-Epel e colaboradores (1988) mostraram que o tamanho dos poros das paredes celulares é controlado pela matriz péctica. A digestão enzimática de algumas pectinas aumenta o tamanho do poro para 10 nm, um valor que altera o limite de difusão irrestrito para proteínas com peso molecular de 17 kg.mol^{-1} para 100 kg.mol^{-1} .

Através de vários estudos sobre os constituintes das paredes celulares pôde-se elaborar modelos de organização dessas moléculas na parede. Carpita

& Gibeaut (1993) descreveram o modelo de parede Tipo I para a maioria das plantas, principalmente as dicotiledôneas como um emaranhado de microfibrilas de celulose se entrelaçando com xiloglicanos, os quais estão embebidos em um gel de pectina rico em ácido urônico e com ligações cruzadas com glicoproteínas ricas em hidroxiprolina.

Todos esses componentes da parede celular vegetal estão organizados de maneira a estabilizar a estrutura e quando a célula está em crescimento, as alterações que ocorrem nesse arranjo são o principal interesse das pesquisas sobre parede celular.

Entre as proteínas estruturais que estão presentes na parede celular, a extensina é provavelmente a melhor estudada. Proteínas não estruturais são também encontradas. Muitas são hidrolases, transferases, esterases, peroxidases e várias outras enzimas que atuam na modificação dos polímeros da parede celular em vários estágios do seu desenvolvimento e diferenciação (Cassab & Varner 1988).

A parede celular de monocotiledôneas é conhecida como sendo do Tipo II. Suas microfibrilas de celulose, semelhantes às do Tipo I, estão interligadas por glicoronoarabinoxilanas (GAX). Os xiloglicanos também encontram-se presentes, mas em menor proporção. O mesmo ocorre com as pectinas, em menor quantidade e que podem se apresentar metilesterificadas e não esterificadas. A maior característica das paredes das Poaceas é a presença de substâncias aromáticas em paredes não lignificadas. Dentre essas substâncias aromáticas, os ésteres de hidroxicinamatos, ferulato e p-coumarato são os encontrados em maior proporção. As GAX encontram-se ligadas nas paredes através de hidroxicinamatos tanto esterificados quanto eterificados e por outras substâncias fenólicas (Carpita 1996).

Durante o crescimento das células vegetais, a parede celular sofre um processo de afrouxamento. Neste processo a deposição de microfibrilas de celulose e dos polímeros da matriz são altamente controlados e isso pode ser

verificado através da análise de constituintes da parede celular conforme mostrado por Chambat e colaboradores (1997) em células de *Rubus fruticosus* cultivadas em suspensão. Muitos pesquisadores acreditam que este afrouxamento seja devido a ação de endo e exoglicanases, que atuam nas hemiceluloses. Outras proteínas, principalmente enzimas, vêm tendo seu papel estudado durante o crescimento da célula vegetal como por exemplo a xiloglicano-glicosil-transferase (XET) (Fanuti et al. 1996, Fry 1993, Nishitani 1995) e a proteína expansina (McQueen-Mason & Cosgrove 1995).

A XET atua cortando uma cadeia de xiloglicano (substrato doador) e provavelmente forma um complexo transitório enzima-polissacarídeo. A porção ligada à enzima do polissacarídeo é então transferida para uma extremidade de um substrato receptor. O receptor pode ser uma outra molécula de xiloglicano ou um oligômero de xiloglicano (Fry 1993).

A expansina não tem atividade catalítica. Durante o processo de expansão da parede, essa proteína rompe as pontes de Hidrogênio entre as microfibrilas de celulose, facilitando o deslizamento direcionado pelo turgor entre as microfibrilas e os outros componentes da parede celular (McQueen-Mason & Cosgrove 1995, Cosgrove 1998).

Além dos mecanismos de crescimento da célula vegetal muitos outros eventos contam com a participação das enzimas presentes na parede celular. Dentre eles, pode ser citada a biossíntese de lignina, envolvendo peroxidases (EC 1.11.1.7), enzimas que participam de inúmeros processos metabólicos. Elas catalisam as interligações entre macromoléculas envolvendo lignina, hemicelulose e glicoproteínas (Whitmore 1978, Fry 1986, Gottahard & Grambow 1992, Talbott & Ray 1992).

Apesar de alguns estudos sobre a participação de peroxidases no processo de lignificação (Bruce & West 1989, McDougall 1991, Melo et al. 1995), pouco é conhecido sobre sua ação na via metabólica desse polifenol.

Através de eletroforese, cromatografia de troca iônica e focalização

isoelétrica de extratos de diferentes plantas contendo peroxidases, têm-se obtido dois grupos distintos dessas enzimas: um ácido e um básico. As proporções com que estes grupos aparecem são bastantes diferentes e dependem ainda das técnicas utilizadas para a sua separação (Gaspar et al. 1985). Estes dois grupos de peroxidases são muito semelhantes, mas o local celular onde ocorrem ainda é muito discutido. Muitas peroxidases catiônicas ocorrem no meio de cultura e no citoplasma de células cultivadas em suspensão (Cortelazzo et al. 1996, Joseleau et al. 1996), assim como na parede celular e em vacúolos (Morales & Ros Barceló 1997). Melo e colaboradores (1997) observaram a atividade de peroxidases catiônicas na oxidação de álcool coniferílico. Os autores sugerem o envolvimento dessas isoenzimas no processo de lignificação.

Nas plantas adultas toda a força tênsil deriva principalmente a partir de uma parede secundária muito grossa característica de muitos tipos celulares de tecidos maduros. A celulose constitui cerca de 30% do peso seco dessas paredes e é de grande importância a montagem de camadas alternadas das microfibrilas. Desta forma, a celulose da parede secundária pode certamente ser considerada como a maior responsável pela sustentação das forças mecânicas exercidas sobre a planta (Delmer 1995).

A lignina é um polímero com subunidades aromáticas derivadas da fenilalanina que aparece como uma matriz ao redor dos polissacarídeos de algumas paredes celulares, principalmente de crescimento secundário. Um primeiro passo da via de formação da lignina é a desaminação do aminoácido fenilalanina a ácido transcinâmico pela enzima fenilalaninamonialase, PAL (EC 4.3.1.5). Essa enzima tem sido muito estudada e é considerada a chave regulatória no metabolismo dos fenilpropanoides.

A atividade da PAL pode ser induzida por infecção (Jones 1984; Hahlbrock & Scheel 1989), ferimento (Tanaka & Uritani 1977, Jones 1984, Hahlbrock & Scheel 1989, Tanaka et al. 1989) e iluminação (Havir & Hanson 1968, Jones 1984, Hahlbrock & Scheel 1989, Parvez et al. 1997). Em dicotiledôneas a PAL

usa como substrato a fenilalanina (Koukol & Conn 1961, Tanaka & Uritani 1977, Gupta & Acton 1979, Havir 1981) enquanto que em gramíneas são usadas a fenilalanina e em algumas ocasiões a tirosina, também utilizada pela tirosinamonialase (Havir et al. 1971, Camm & Towers 1973, Jones 1984). As razões para diferentes especificidades de substrato ainda não foram totalmente esclarecidas.

A PAL tem sido purificada a partir de vários vegetais e está presente na forma de uma simples isoenzima em algumas espécies e com formas múltiplas em outras. O aumento da atividade da PAL foi observado também em cultura de células de pinheiro, após eliciação com fungo (Campbell & Ellis 1992), culturas de *Nicotiana tabacum* tratadas com pectinase (Negrel & Javelle 1995) e culturas em suspensão de cevada tratadas com quitina (Peltonen et al. 1997).

Variações na composição da lignina ocorrem dentro de espécies vegetais, tecidos, tipos celulares e com o estágio de desenvolvimento da planta (Campbell & Sederoff 1996). A diversidade molecular das ligninas é freqüentemente expressa em termos do conteúdo relativo de três unidades estruturais de fenilpropano, originadas a partir da polimerização desidrogenativa de três álcoois hidroxicinâmílicos (Higuchi 1990): *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico. A polimerização desses três monolignóis dá origem às ligninas, com unidades de *p*-hidroxifenilpropano, guaiacil e siringil (Higuchi 1990).

Apesar da grande heterogeneidade nos tecidos e paredes celulares, as ligninas de gimnospermas são predominantemente compostas de unidades guaiacil, enquanto que as ligninas de angiospermas são constituídas principalmente de uma mistura do tipo guaiacil-siringil, sendo notadas grandes variações na proporção dos mesmos entre diferentes espécies. Em gramíneas e cereais contudo, os três tipos de unidades são encontrados, com uma proporção de *p*-hidroxifenilpropano menor que guaiacil, por sua vez menor que siringil (Lewis & Yamamoto 1990).

Outro nível de complexidade na biogênese da lignina das paredes

celulares está na distribuição ultraestrutural desse polímero. Existe ainda muita incerteza a respeito dos aspectos temporais da lignificação no desenvolvimento do tecido e a relação entre a localização ultraestrutural e a natureza química da lignina depositada. Como demonstrado em milho, o processo de lignificação dos tecidos não ocorre de maneira simultânea e na mesma proporção, indicando ser este um fenômeno temporal e espacial, que varia de acordo com o tipo de tecido e parede celular (Joseleau & Ruel 1997). Essas diferenças nos tipos de lignina também podem ser observadas quando do ataque de fungo branco em raízes de trigo, onde a morfologia de degradação da lignina pelo patógeno não segue o mesmo padrão (Burlat et al. 1997).

As árvores apresentam necessidade de suporte estrutural para o transporte de água. Devido a isso as plantas sintetizam altos níveis de lignina que variam de 15 a 36% do peso seco das madeiras. Poucos tipos celulares acumulam lignina durante o seu desenvolvimento. Os elementos do xilema e esclerênquima acumulam lignina e também ocorrem outras modificações na parede celular, tais como espessamento da parede celular secundária o que contribui para dar rigidez à célula (Whetten & Sederoff 1995).

No entanto, recentes estudos sobre interação planta-patógeno têm demonstrado que a parede celular de tecidos jovens pode sofrer lignificação se as células forem danificadas por ferimentos ou sofrerem ataque por fungos. É portanto aceitável que também a parede celular primária de tecidos imaturos contenham normalmente pouca lignina, que pode não ser detectada por métodos convencionais de análise e de coloração histológica como por exemplo a coloração pelo azul de astra e safranina (Bukatsch 1972) e a reação da floroglucina (Vallet et al. 1996). Foi observada a presença de lignina em tecidos não vasculares de coleoptile de milho, onde se considera particularmente a função da lignina como um regulador potencial do crescimento, através do endurecimento da parede celular (Müsel et al. 1997). A deposição de lignina pode ser induzida em muitos tipos celulares por doença ou ferimento, indicando que os

genes envolvidos na sua biossíntese respondem tanto a estímulos do desenvolvimento como do meio ambiente. Além disso, a lignificação pode ser um processo de defesa que a célula vegetal recorre ante o ataque de patógenos (Vance et al. 1980).

Existe um grande interesse em modificar os conteúdos e/ou componentes dos polímeros de lignina da parede celular como um meio para melhorar a eficiência do processo de produção de papel ou o aumento da digestibilidade de forragens para animais ruminantes (Boudet & Grima-Pettenati 1996, Campbell & Sederof 1996).

O processo de lignificação pode ser analisado através do emprego de culturas de células vegetais onde se estimulam as células a produzirem determinadas substâncias, colocando-se no meio de cultura estruturas indutoras deste mecanismo.

O emprego de culturas de células vegetais oferece ainda as vantagens de produzir um tecido asséptico, possibilitando uma inoculação de células uniforme em um ponto definido de tempo e a produção de grande quantidade de material para análises bioquímicas.

A quitina é um polissacarídeo composto de resíduos de N-acetil-D-glicosamina ligados por ligação $\beta(1\rightarrow4)$. Este polissacarídeo é componente estrutural de muitos fungos e exoesqueleto de invertebrados (Bartnicki-Garcia 1968). Os oligossacarídeos formados a partir desse polímero eliciam respostas relacionadas com o sistema de defesa de várias plantas e, via de regra, a lignificação da parede celular, como ocorre em células de pinheiro cultivadas em suspensão (Lesney 1989, 1990).

A exposição de células vegetais a oligossacarídeos de quitina e quitosana faz com que haja a produção de quitinases pelas mesmas (Molano et al. 1979). Embora a atividade dessas enzimas em tecidos vegetais seja tão baixa que não possa ser detectada em plantas saudáveis, elas são altamente expressadas após infecção por patógenos ou tratamento com eliciadores (Nichols et al. 1980).

Pearce & Ride (1982) observaram a presença de lignificação nas paredes celulares de folhas de trigo tratadas com oligômeros de quitina de diversos tamanhos e concluíram que os oligômeros de menor tamanho não induziam a lignificação, por serem rapidamente metabolizados pelas células. Barber e colaboradores (1989) separaram e identificaram os oligômeros de quitina que induziram lignificação em folhas de trigo, demonstrando que apenas os tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros possuíam atividade eliciadora.

Cultura de tecidos vegetais tem sido utilizada para estudos da atividade biossintética de plantas desde 1902. Alguns sistemas *in vitro* permitem a produção em larga escala de metabólitos secundários importantes produzidos pelas células. A possibilidade de se estudar as vias metabólicas dos produtos de defesa sintetizados frente a um determinado estresse é uma vantagem muito grande para o desenvolvimento de estudos nessa área.

Pensando nas vantagens apontadas e nas diferenças entre as paredes celulares de monocotiledôneas e dicotiledôneas, o presente trabalho foi desenvolvido utilizando culturas de células vegetais de cana-de-açúcar e laranja cultivadas em meio líquido ou sólido, visando contribuir para o conhecimento das respostas morfológicas e bioquímicas dessas plantas quando submetidas a hidrolisados de quitina.

Alterações celulares decorrentes da adição dos hidrolisados de quitina em diferentes períodos de tempo, em dose suficiente para provocar alterações morfofisiológicas detectáveis e não letais à planta, foram determinadas preliminarmente em células de *Rubus fruticosus*, espécie cultivada no laboratório de biologia celular vegetal do Departamento de Biologia Celular da Unicamp.

Pelas diferenças de composição das paredes celulares e diversidade das culturas, foram usadas linhagens bem estabelecidas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L., Poaceae) e de laranja (*Citrus aurantium* L. Rutaceae).

4. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

**Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase
elicitation by chitin oligosaccharides in isolated
Citrus aurantium L. cells**

Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase elicitation by chitin oligosaccharides in isolated Citrus aurantium L. cells

Maria Izabel Gallão¹, Edy Sousa de Brito¹, Manuel Pedro Salema Fevereiro² and Angelo Luiz Cortelazzo^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 13081-970, SP, Brasil; ²Laboratório Biotecnologia de Células Vegetais, Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB-UNL), Apartado 127, Oeiras P-2780, Portugal

*Author for correspondence: Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), CP 6109, Campinas, 13081-970, São Paulo, Brasil.

Telefone: (55) (19) 788-7786

FAX: (55 19 788-7821)

e-mail: angelo@obelix.unicamp.br

Running head: Enzyme elicitation by chitin of Citrus aurantium cells

Summary

Suspension-cultured citrus cells responded to treatment with chitin oligosaccharide (final concentration, 10^{-9} M) for up to 8h. Control cultures received sterile distilled water as an elicitor. These oligomers induced peroxidase (EC.1.11.1.7) and L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC.4.3.1.5.) activities 1-3 h after the initial stimulation. Peroxidases and PAL have important roles in protecting plants from damage by biotic and abiotic factors, possibly through the production of lignin and phytoalexin. Extracellular peroxidase activity, detected by the oxidation of guaiacol, increased from 0.20 U ml^{-1} after 1 h to 0.45 U ml^{-1} at 3 h followed by a gradual decrease up to 8 h later. A similar behavior was seen with PAL (0.020 U g^{-1} of 1h and 0.028 U g^{-1} at 3 h with a decrease thereafter). The peroxidase isoenzyme pattern based on isoelectric focusing revealed predominantly basic isoenzymes in these cells, suggesting that these isoenzymes participate in the stress response C. aurantium.

Keywords: chitin, elicitation, peroxidase, PAL, Citrus aurantium, tissue culture

1- Introduction

Several plant cell defence reactions are induced by biotic elicitors derived from the cell walls of pathogens. Chitin is an important component in insects and fungi and is widely used as an eliciting agent experimentally. When fragmented, chitin (β -1,4-N-acetylglucosamine) can also elicit defensive responses in plants, including phytoalexin production [1], localised deposition of lignin and an increase in peroxidase activity [2]. Xyloglucan oligosaccharides [3, 4] and chitosan [5] are other polysaccharides used as elicitors.

Lignification is an important antimicrobial defence strategy in many systems [6]. The last step of lignin biosynthesis is the polymerisation of cinnamoyl alcohol catalysed by peroxidase using H_2O_2 as an electron acceptor. Peroxidases (EC 1.11.1.7) are heme-containing enzymes that are widespread among plants [7]. These enzymes are involved in indole-3-acetic acid (IAA) metabolism [8] and in pathogen resistance [9].

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (EC 4.3.1.5) occurs as multiple isozymes in plants and its activity is highly regulated during development and during responses to different environmental cues [10]. Several studies in simplified model systems have shown the rapid accumulation of specific classes of phenolic compounds in response to abiotic and biotic stimuli [11-14].

There is increasing interest in the use of cultured cells to study the mechanism of host-pathogen interactions. Since these interactions are very complex, an experimental system allowing the simultaneous analysis of rapid and long-term responses is clearly of great advantage.

Considering the importance of peroxidases and PAL in the defence mechanisms of plant cells, we have investigated the changes in the activities of these two enzymes in Citrus aurantium cells cultivated in suspension and exposed to chitin oligosaccharides.

2- Materials and Methods

Plant material

Citrus aurantium cells derived from calluses were sub-cultured every 2-3 weeks into Murashige and Tucker medium [15] containing malt extract (0.5 g L^{-1}) at $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Cell suspensions were initiated by transferring a portion of a callus to 20 mL of liquid medium in the dark, followed by incubation in a shaker at 120 rpm.

Elicitation assay

The chitin solution was prepared as described by Villegas and Brodelius [16] and was added to the C. aurantium cultures, to a final concentration of 10^{-9} M for 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h. Control cultures received sterile distilled water as an elicitor. The experiments were repeated three times.

Proteins

The protein content of the culture medium ($\mu\text{g mL}^{-1}$) and cell extracts (mg g^{-1} dry weight) was determined using the Bradford dye-binding technique [17] with bovine serum albumin (Sigma) as a standard.

Peroxidase activity

Peroxidase activity was assayed spectrophotometrically based on the oxidation of guaiacol. The reaction mixture contained 5 mM guaiacol and 0.5 mM hydrogen peroxide in 25 mM phosphate buffer (pH 6.5). The activity was expressed in U mL^{-1} , using $\epsilon_{470\text{nm}}=26.6$ for tetraguaiacol [18].

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity

Lyophilized material (0.3 g) was homogenized in liquid nitrogen and then mixed with 6 mL of ice-cold 0.5 M borax-borate buffer (pH 8.8), followed by a 30 min centrifugation at 17,000 g and 4 °C. The resulting supernatant was filtered (5 μm) and used in the enzyme assays. Five hundred microliters of the extract were added to 1900 μL of borax-borate and 600 μL of a 0.1 M L-phenylalanine solution, and then incubated at 37 °C. The change in absorbance at 290 nm between 15 and 75 min after the addition of enzyme was used to calculate PAL activity [12].

Isoelectric focusing of the peroxidases from culture medium

Isoelectric focusing was performed using a Phast System system and Phast Gel IEF 3-9 (Pharmacia). The protein bands were detected by silver staining. Peroxidases were detected by incubating the gels in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) containing 25 mM guaiacol in the presence of 1 mM H_2O_2 [19].

3- Results

Peroxidase activity

Chitin fragments enhanced the activity of extracellular peroxidase in cell suspension cultures of C. aurantium by five-fold after 1-3 h followed by a decrease back to the initial value at 4h. There was no change in the control culture during the experiment time (fig. 1a).

PAL activity

PAL activity increased in the first 3 h. The increase, from 0.020 U g^{-1} at 1 h to 0.028 U g^{-1} at 3 h, was followed by a decrease at 4 h (0.004 U g^{-1}). PAL activity also increased in the control experiments, though less markedly, from 0.010 U g^{-1} at 1 h to 0.020 U g^{-1} at 3 h. Thereafter, the activity decreased reaching a final value similar to that of the chitin-treatment sample (fig. 1b).

Proteins

After the addition of chitin, the protein levels in the medium increased from $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ at 1 h to $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ at 3 h, but decreased to $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ after 4 h. The control cultures showed a similar behaviour (fig. 1c). The cytoplasmic protein levels varied from 10 to 20 mg g^{-1} in the treated cultures and from 5 to 25 mg g^{-1} in the control

cultures. There were no significant differences ($p < 0.05$) between the control and chitin-treated cultures (fig. 1d).

Isoelectric focusing

The C. aurantium peroxidase isoenzyme patterns showed the presence of basic isoenzymes in the control and chitin-treated cultures. Elicited cultures showed an increased intensity in bands with pI 8.45 and 8.65 after 1-3 h of stimulation with chitin (fig. 2a). Isoenzymes with pI 6.85, 7.35, 8.15 and 9.30 (fig. 2a) were also present. After 4 h, isoenzymes with pI 8.15, 8.45 and 9.30 were detected. From 1 h to 4 h, the bands were more strongly marked in the chitin-treated material whereas at 6 h and 8 h, the controls had bands with a higher intensity (fig. 2b).

4- Discussion

The biotic elicitor effect has been observed in species such as Vicia faba [20], potato [12], soybean [21], pea [4] and pine cell suspension cultures [22].

Peroxidases catalyze the cross-linking of pre-formed cell wall phenols and are involved in lignin polymerization [23]. These enzymes play an important role in the defence against pathogens, with an increase in their activity being related to mechanical stress or to exposure to a fungal elicitor [24-26].

The increase in the peroxidase activity of C. aurantium cells treated with chitin fragments indicates that these fragments are capable of inducing a stress response in these cells. As many authors have observed, chitin has the capacity to elicit suspension-cultured cells from species such as slash pine [27], potato [12], wheat [28] and sugarcane (unpublished data).

PAL catalyses the first step of the biosynthesis of defence-related phenylpropanoids by synthesizing antimicrobial metabolites (e.g. phytoalexins and lignin). In cultured cells of C. aurantium, an increase in this enzyme activity is related to the fluoroglucinol reaction (data not shown) in which the higher deposition of red precipitate occurs after 3 h. Increased PAL activity in response to biotic and abiotic factors has been reported in many species, including maize coleoptiles [11], potato (Solanum tuberosum) suspension cultures [12], hop cell suspension cultures [29] and Citrus limon seedlings [30].

Elicited and non-elicited cultures express basic isoenzymes. Many attempts have been made to define the functions of anionic or cationic peroxidase isoenzymes. Anionic isoenzymes have been suggested to be involved in the cross-linking of cell wall polymers and in lignification [31], although cationic peroxidases have also been implicated in the latter process [32, 33]. Our results show that the basic peroxidase isoenzymes of C. aurantium participate in the response to stress.

The increased PAL and peroxidase activities observed in C. aurantium cells in the first hours showed that these cells quickly respond to the chitin elicitor. The subsequent decrease to lower values for both enzyme activities indicates the capacity of this culture to produce non-lignified cells and to consequently restore their normal metabolism. A similar behaviour has been observed in barley [5], carrot [34] and tobacco [14].

Acknowledgement

We wish to thank to Capes/PICDT-Brazil for supporting M.I. Gallão.

5- References

- [1] A. Yamada, N. Shibuya, O. Kodama, T. Akatsuka, Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (1993) 405-409.
- [2] A.G. Darvill, C. Augur, C. Bergmann, R.W. Carlson, J.J. Cheong, Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology* 2 (1992) 181-198.
- [3] J.P. Joseleau, A.L. Cortelazzo, G. Chambat, K. Ruel, Activation of peroxidases from plant cell suspensions by xyloglucan oligosaccharide elicitors. *Plant Peroxid. Newslett.* 8 (1996) 8-13.
- [4] H.M. Warneck, T. Haug, H.U. Seitz, Activation of cell wall-associated peroxidase isoenzymes in pea epicotyls by a xyloglucan-derived nonasaccharide. *J. Experim. Bot.* 47 (1996) 1897-1904.
- [5] S. Peltonen, L. Mannoen L., R. Karjalainen, Elicitor-induced changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in barley cell suspension cultures. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 50 (1997) 185-193.
- [6] R.L. Nicholson, R. Hammerschmidt, Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30 (1992) 369-389.
- [7] K.G. Wellinder, Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Op. Struc. Biol.* 2(1992) 388-393.

- [8] H.J. Grambow, Langenbeck-Schiwich The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxidase and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. Plant 157(1983) 131-137.
- [9] B.M. Moerschbacher, Plant peroxidases: involvement in response to pathogens, in: C. Penel, T. Gaspar and H. Greppin (Eds), Plant Peroxidases 1980-1990, University of Geneva, Switzerland, 1992, pp. 91-99.
- [10] A.M. Boudet, C. Lapierre, J. Grima-Pettenati, Biochemistry and molecular biology of lignification. Phytol 129 (1995) 203-236.
- [11] M.M. Parvez, K. Wakabayashi, T. Hoson, S. Kamisaka, White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. Physiol. Plant. 99 (1997) 39-48.
- [12] H. Dörnenburg, D. Knorr, Evaluation of elicitor- and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (Solanum tuberosum) suspension cultures as a model system for plant tissues. J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 4173-4177.
- [13] D.M. Cahill, J.A. McComb, A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of Eucalyptus calophylla (field resistant) and E. marginata (suspetible) when infected with Phytophthora cinnamomi. Physiol. Mol. Plant Pathol. 40 (1992) 315-332.

- [14] J. Negrel, F. Javelle, Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase- or pronase-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol. Plant.* 95 (1995) 569-574.
- [15] T. Murashige , D.P.H. Tucker Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. – In: *Proc. First Int. Citrus Symp. Vol III* (H.D. Chapman, ed.), Univ. of California, Riverside. (1969)pp. 1155-1161.
- [16] M. Villegas, P.E. Brodelius, Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* 78 (1990) 414-420.
- [17] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [18] P. George, Intermediate compound formation with peroxidase and strong oxidizing agents. *J. Biol. Chem.* 201 (1953) 413-451.
- [19] N.S. Melo, J.M.S. Cabral, M.P. Fevereiro, Extracellular peroxidases from cell suspension cultures of Vaccinium myrtillus. Purification and characterization of two cationic enzymes. *Plant Sci.* 106 (1995) 177-184.
- [20] J.J. Casal, R.A. Mella, C.L. Ballaré, S. Maldonado, Phytochrome-mediated effects on extracellular peroxidase activity, lignin content and bending resistance in etiolated Vicia faba epicotyls. *Physiol. Plant.* 92 (1994) 555-562.

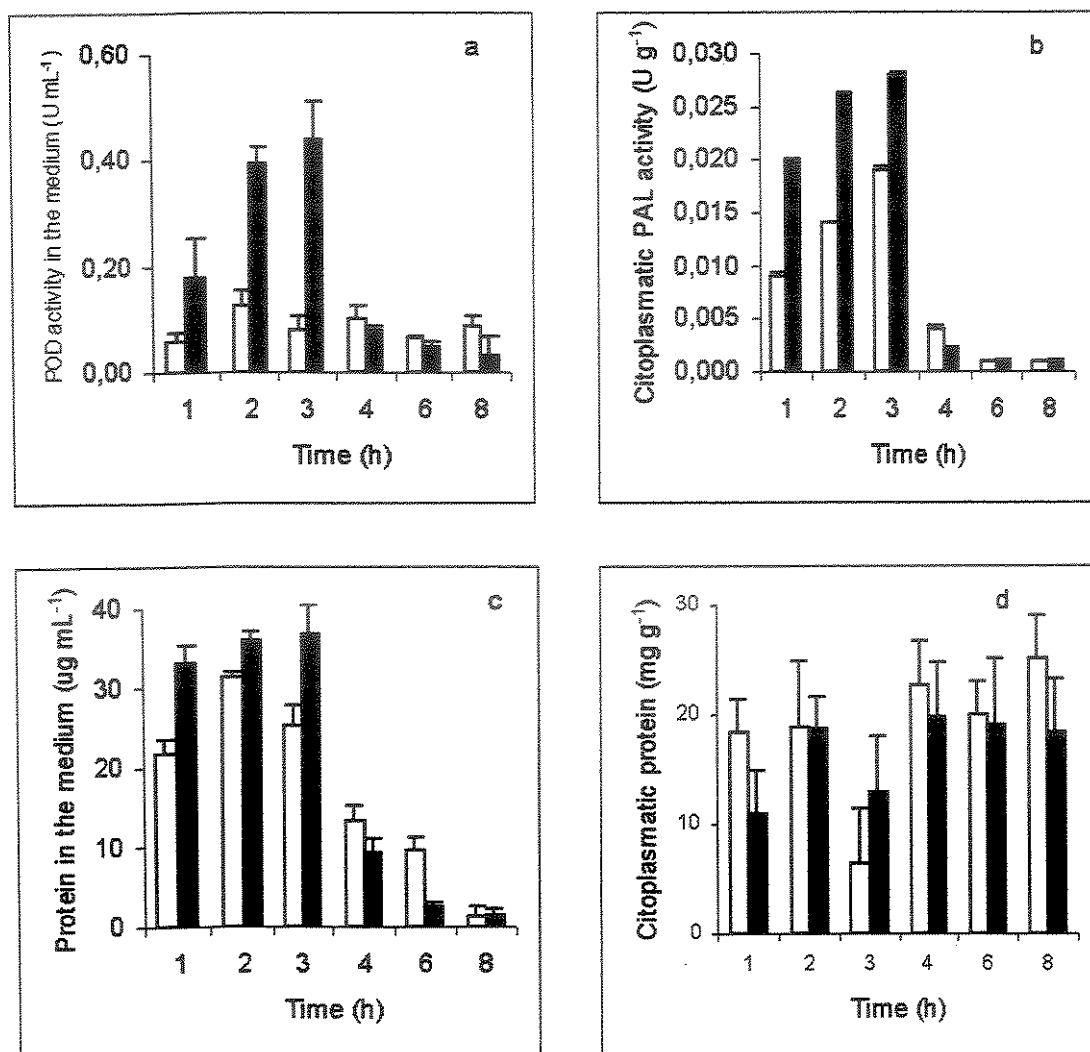
- [21] L.D. Gómez, M.R. Braga, S.M.C. Dietrich, Involvement of active oxygen species and peroxidases in phytoalexin production induced in soybean hypocotyls by an elicitor from a saprophytic fungus. *Ciência Cultura* 46 (1994) 153-156.
- [22] M.P. Popp, M.S. Lesney, J.M. Davis, Defense responses elicited in pine cell suspension cultures. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 47 (1997) 199-206.
- [23] R.W. Whetten, J.J. MacKay, R.R. Sederoff, Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 585-609.
- [24] K. Wakamatsu, U. Takahama, Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiol. Plant.* 88 (1993) 167-171.
- [25] M.M. Campbell, B.E. Ellis, Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. I. Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta* 186 (1992) 409-417.
- [26] B. Messner, M. Boll, Extracellular peroxidases of suspension culture cells of spruce (*Picea abies*): fungal elicitor-induced inactivation. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 36 (1994) 81-90.
- [27] M.S. Lesney, Effect of 'elicitors' on extracellular peroxidase activity in suspension-cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20 (1990) 173-175.

- [28] P. Vander, K.M. Varum, A. Domard, N.E.E. Gueddari, B.M. Mourschbacher
Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and
chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant
Physiol.* 118 (1998) 1353-1359.
- [29] M.T.S. Trevisan, J.J.C. Scheffer, R. Verpoorte, Effect of elicitation on the
peroxidase activity in some cell suspension cultures of hop, Humulus lupulus.
Plant Cell Tis. Org. Cult. 48 (1997) 121-126.
- [30] H. Prieto, M. Chiong, D. Seelenfreund, J. Garrido, A. Quaas, L.M. Pérez, *Citrus
limon* seedlings without functional chloroplasts are unable to induce
phenylalanine ammonia-lyase in response to inoculation with *Alternaria
alternata*. *J. Plant Physiol.* 150 (1997) 645-651.
- [31] T. Gaspar, C. Penel, F.J. Castillo, H. Greppin, A two step control of basic and
acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol.
Plant.* 64 (1985) 77-83.
- [32] X. Zheng, R.B. van Huystee, Oxidation of tyrosine by peroxidase isozymes
derived from peanut suspension culture medium and by isolated cell walls.
Plant Cell Tis. Org. Cult. 25 (1991) 35-43.
- [33] R.B. van Huystee, X. Zheng, Cationic peanut peroxidase and the oxidation of
ferulic acid. *Phytochem.* 34 (1993) 933-999.
- [34] Y. Hwan, Y.J. Yoo, Peroxidase production from carrot hairy root cell culture.
Enzyme Microb. Technol. 18 (1996) 531-535.

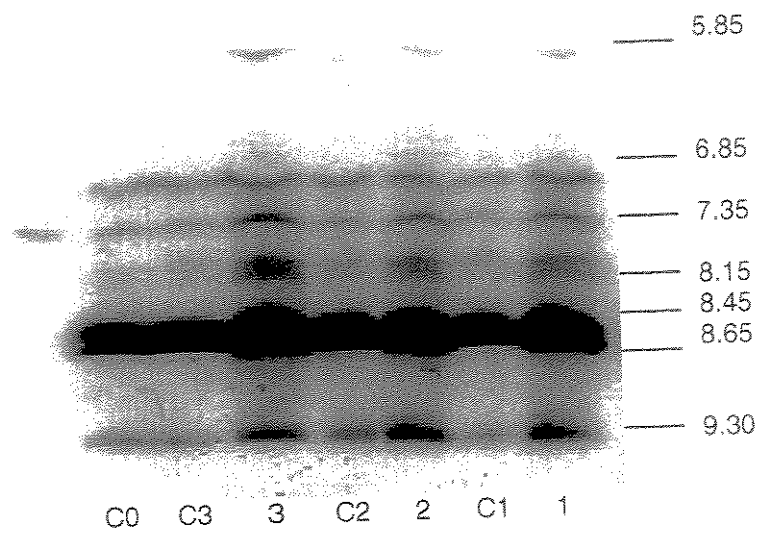
Legends

Fig. 1. a) Peroxidase activity in the culture medium from suspension-cultured C. aurantium cells treated with chitin (■) or water (□). b) PAL activity in the cells of the C. aurantium treated with chitin (■) or water (□). c) Protein levels in the culture medium from C. aurantium cell suspension treated with chitin (■) or sterile distilled water (controls □). d) Protein levels in extract of cells treated with chitin (■) or water (□). The columns represent the mean $\pm$ S.D.

Fig. 2a and b. Effects of chitin on the activity of extracellular peroxidase isoforms in suspension-cultured Citrus aurantium cells.

**Figure 1**

a



b

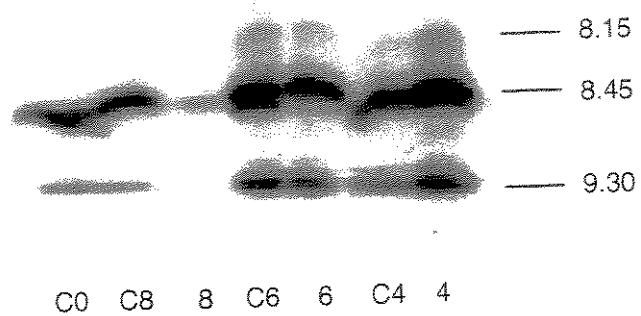


Figure 2

5. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

**Alterações morfológicas em células de Citrus
aurantium L. cultivadas em suspensão e
submetidas a hidrolisados de quitina.**

**Alterações morfológicas em células de Citrus aurantium
L. cultivadas em suspensão e submetidas a hidrolisados
de quitina.**

Maria Izabel Gallão^{1,2} & Angelo Luiz Cortelazzo³

Universidade Estadual de Campinas – Unicamp

Departamento de Biologia Celular, Caixa Postal: 6109

13081-970 – Campinas – Brasil

¹ Parte da Tese de doutorado de M.I.Gallão;

² Endereço permanente: Departamento de Biologia, Universidade Federal da Paraíba – CEP: 58071-001, João Pessoa, PB.

³ Autor a quem a correspondência deve ser encaminhada.

Resumo

Diversos oligossacarídeos apresentam atividade biológica quando adicionados a suspensões celulares. No presente trabalho foram acompanhadas as alterações morfológicas causadas pela adição de soluções de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidrolisado de quitina em células de Citrus aurantium cultivadas em suspensão. Os resultados revelaram uma ação rápida, detectada a partir de 1h após a adição dessas moléculas, atingindo seu efeito máximo após 3h de incubação e retornando gradativamente às suas condições iniciais, o que foi verificado após 8h de incubação. As principais alterações ocorreram nas paredes celulares, que sofrem processo de lignificação detectado através de colorações com azul de toluidina e floroglucina/HCl. Além disso, o material protéico disperso pelo citoplasma das células se torna menos reativo a corantes aniônicos, indicando uma diminuição na disponibilidade de radicais catiônicos nas proteínas, seja pela degradação das mesmas, seja pela sua complexação e conseqüente diminuição do acesso ao corante. Os grãos de amido tornam-se menores e são notados inúmeros vacúolos autofágicos e secreções de material para o espaço pericelular no material tratado. Além da lignificação para as células mais periféricas dos aglomerados celulares da suspensão, pôde ser notada uma desagregação dos polissacarídeos formadores das paredes celulares, confirmando o efeito já observado para outros experimentos utilizando diferentes oligossacarídeos.

Palavras chaves: Eliciação; quitina; Citrus; lignificação

Introdução

As reações de defesa da célula vegetal frente a um patógeno incluem a lignificação (Vance et al., 1980), produção de peroxidase (McGhie et al., 1997; Trevisan et al., 1997) e β -1,3 glicanase (Boller, 1991; Graham and Graham, 1991) dependem do tempo de invasão e da localização dessas respostas de defesa individuais.

A lignificação é considerada um evento tardio na diferenciação da parede celular (Iiyama et al., 1993) e está restrita a tecidos que pararam de crescer. Assim, ao contrário de outros tipos de compostos fenólicos (Fry, 1986), a lignina não é considerada um constituinte das paredes primárias de tecidos em crescimento (Carpita & Gibeaut, 1993; Iiyama et al., 1993). Contudo, recentes estudos sobre a interação planta/patógeno têm demonstrado que os tecidos jovens quando invadidos por fungos, parasitas ou ferimentos podem apresentar lignificação de suas paredes celulares (Walter, 1992), com grandes consequências para a resistência da planta ao patógeno (Wallace & Fry, 1994; Boudet et al., 1995).

A quitina é um polissacarídeo sem ramificações composto por monômeros de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopirranose, o qual forma um composto fibrilar, componente das paredes celulares de fungos. Tem sido mostrado que a quitina é um eliciador ativo na indução da lignificação em diferentes tipos celulares, como

por exemplo em células de trigo cultivadas em suspensão (Gotthard & Grambow, 1992; Vander et al., 1998).

As alterações decorrentes de um determinado estresse podem ser detectadas morfológicamente através de colorações citoquímicas, altamente específicas. A reação do PAS (ácido periódico seguido do reativo de Schiff) por exemplo, se presta à detecção de polissacarídeos contendo hidroxilas vicinais livres (Cortelazzo, 1992) enquanto a reação da floroglucina é específica para compostos fenólicos (Clifford, 1974). Do mesmo modo, o uso de corantes ácidos e básicos tem servido para a detecção microscópica de grupos ionizados (Begnami & Cortelazzo, 1996, Silva et al., 1997). Essas informações podem ser complementadas com uma análise ultraestrutural e dosagens bioquímicas, contribuindo assim para a compreensão das respostas geradas pela planta a partir do ataque de patógenos ou da adição de compostos com inequívoca atividade biológica.

Assim, no presente trabalho foram estudadas as alterações provocadas pela adição de oligômeros de quitina em células de Citrus aurantium L. cultivadas em suspensão, através de métodos citoquímicos e ultraestruturais de análise.

Material e Métodos

Material Vegetal - Células de Citrus aurantium originadas a partir de calos foram sub-cultivadas por 2-3 semanas em meio de cultura Murashige & Tucker (1969) suplementado com extrato de malte (0,5 g/L). As suspensões celulares foram iniciadas através de porções de calo transferidos para 20 mL de meio de cultura líquido, mantidos no escuro, à $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e agitação constante de 120 rpm.

Ensaio de eliciação – 1g de quitina, obtida de casca de caranguejo, foi dissolvida em 35 mL de água destilada. Essa mistura foi aquecida a 90°C por 30 minutos e em seguida o pH foi ajustado para 5,0 com HCl concentrado, o volume final da solução foi ajustado para 50 mL e autoclavado a 121°C por 30 minutos (Villegas & Brodelius, 1990). Esse hidrolisado foi adicionado nas culturas de C. aurantium a uma concentração final de 200 $\mu\text{g/mL}$. Aos controles foi adicionada água destilada estéril ao invés do eliciador. Os períodos de tratamento foram de 1, 2, 3, 4, 6, e 8 horas com seus respectivos controles. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Análises estruturais e ultra-estruturais

Métodos citoquímicos - As suspensões foram filtradas em um funil de vidro (porosidade 40-90 μm) e as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 0,1% em tampão fosfato 50mM, pH 7,0 por 4 horas a 4°C . O material foi então desidratado, embebido em parafina e cortado

com 7 μm de espessura. Parte dos cortes foi corada com Xylidine Ponceau (XP) a pH 2,5 para a detecção de radicais catiônicos totais (Cortelazzo & Vidal, 1991), enquanto outra parte foi corada com Azul de Toluidina (AT) 0,025% ($\lambda_{\text{max}} = 625$ nm) em tampão McIlvaine pH 4,0 para detecção de radicais aniônicos e metacromasia ($\lambda_{\text{max}} < 590$ nm) (Vidal, 1977). Para a detecção de polissacarídeos neutros, foi realizada a reação do PAS, segundo Cortelazzo (1992). Finalmente, para a detecção de lignina, foi utilizada a reação da floroglucina/HCl (Vallet et al., 1996).

Foram ainda realizadas 40 medidas do diâmetro dos grãos de amido do material controle e após 3 horas de tratamento com os oligômeros de quitina, para o material corado pela reação do PAS (Cortelazzo, 1992). O tamanho dos grãos foi calculado com um limite de confiança de 5%.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - As células foram fixadas por 18 horas em solução contendo glutaraldeído 2,5%, sacarose 3% e CaCl_2 5mM em tampão fosfato pH 7,2, à 4 $^{\circ}\text{C}$, seguindo-se pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão. A desidratação foi feita em acetona, seguida de embebição em resina Spurr (1969). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0.2% e as observações foram feitas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss, Leo 906), operando em 60 e 80 kV.

Análises bioquímicas

Extração e dosagem de amido - Realizaram-se em triplicata, a partir de 25 mg de células liofilizadas. Para a extração de amido colocou-se o material em 5 mL de metanol, clorofórmio e água (MCA) 12:5:3 v/v/v, submetendo-o a duas centrifugações de 4.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante, contendo os açúcares livres, foi guardado e ao precipitado foi acrescentado 5 mL de etanol 10% e feita nova centrifugação. A seguir o sobrenadante foi guardado e ao precipitado foi adicionado 5 mL ácido perclórico 30% (PCA) e centrifugado duas vezes a 4.000 g durante 10 minutos. Com os sobrenadantes realizaram-se dosagens de amido, segundo o método de antrona (McCready et al., 1950). Os valores foram expressos em mg de amido por grama de peso seco. As análises foram realizadas em triplicata.

Proteínas totais – 25 mg de células liofilizadas foram extraídas com NaOH 0,1N e centrifugadas. O sobrenadante foi usado para a determinação das proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando Soro Albumina Bovina como padrão. Os valores foram expressos em mg de proteínas por grama de peso seco. As análises foram realizadas em triplicata.

Estatística - Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, sendo calculada a diferença mínima significativa (DMS) a 5%.

Resultados

Os resultados das diversas colorações encontram-se descritos na Tabela 1. Pode ser notada uma maior presença de açúcares ácidos e de proteínas para o material controle e nos tempos finais de observação. Esses valores decrescem até 3h de tratamento, voltando às respostas iniciais gradualmente. Em termos de açúcares neutros, seja na parede celular, seja no citoplasma, as respostas foram semelhantes para todo o período analisado. Finalmente, houve um aumento de resposta à reação com floroglucina a partir do tempo 0, atingindo intensidade máxima após 3h de incubação e retornando em seguida ao perfil inicial, com resposta negativa ao método (Tabela 1, Fig. 1A e 1B).

No citoplasma, os grãos de amido corados pelo método do PAS são intensamente corados. Entretanto, observa-se que no material após 3h de incubação esses grãos parecem estar mais agregados e possuírem menor tamanho quando comparados ao material controle (Fig. 1C e 1D).

As células de C. aurantium observadas ao microscópio eletrônico apresentaram núcleos eucromáticos e com um proeminente nucléolo, tanto para o material controle quanto para o tratado nos diferentes tempos observados (Fig. 1E e 1F). Pode ainda ser notada cromatina condensada na região do envoltório nuclear em muitas células do material tratado após 2 a 4 horas (Fig. 1E), mas não para os tempos mais longos (Fig. 1F).

As paredes celulares primárias do material se mostraram espessas e no citoplasma foi notada a presença de grande quantidade de amido e vacúolos (fig.

1F e 2A). Tanto no material controle quanto no tratado, não foram observadas diferenças no tamanho e quantidade de vacúolos, mitocôndrias e outras organelas citoplasmáticas (Fig. 2A). Entretanto, o material tratado apresentou inúmeras vesículas autofágicas, para todos os tempos analisados (Fig. 2B-D). Presença de vesículas contendo no seu interior material citoplasmático sendo secretado para o espaço pericelular (Fig. 2E).

As paredes das células do material controle apresentaram-se íntegras, com um aspecto fibrilar característico (Fig. 2F). O tratamento com o hidrolisado de quitina provocou uma desagregação dos polissacarídeos na superfície externa das mesmas, para todos os tempos analisados (Fig. 2G-J). Esse comportamento se deu também para os tempos mais longos, principalmente na periferia dos agregados celulares formados na suspensão. As fibrilas que se desprendem da estrutura da parede apresentaram-se mais elétron-densas do que o restante da parede celular (Fig. 2G e 2I).

A análise do tamanho dos grãos de amido das células coradas pelo PAS revelou uma diminuição significativa no diâmetro médio desses grãos de $3,51 \pm 0,88 \mu\text{m}$ para o material controle para $2,43 \pm 0,57 \mu\text{m}$ para o material após 3h de incubação (Fig. 3).

Os resultados obtidos nas dosagens de amido e proteínas totais nas células de C. aurantium encontram-se descritos na Tabela 2.

Nas células sem a adição do hidrolisado de quitina o amido sofre uma redução significativa a partir de 1h (de 358 para 204 mg/g) de incubação

aumentando a seguir para valores menores do que no início do experimento e mantendo-se constante (~300 mg/g). Para o material tratado, há um comportamento inverso, com aumento da quantidade de amido a partir de 1h e estabilização nos mesmos níveis do controle. Entretanto, não foram notadas diferenças significativas entre o material controle e o tratado para cada tempo utilizado a partir de 1h de incubação. A quantidade de amido dosada correspondeu a cerca de 28 a 30% da matéria seca.

Nas dosagens de proteínas não foram notadas diferenças significativas entre o material controle e o material tratado. O conteúdo protéico dosado foi da ordem de 2% em relação à massa de matéria seca (Tabela 2)

Discussão

Como descrito em vários trabalhos, o tempo de eliciação com oligossacarídeos de quitina se situa entre 6-24 horas de incubação (Pearce & Ride, 1982; Ren & West, 1992) podendo entretanto variar muito com a espécie vegetal utilizada. Funk & Brodelius (1990) por exemplo, observaram em células de Vanilla planifolia cultivadas em suspensão, um pico máximo de atividade enzimática por volta de 40 horas. No presente trabalho, as modificações mais contundentes foram observadas após 3 h de tratamento. Esses resultados morfológicos confirmam aqueles obtidos para as atividades enzimáticas de peroxidases e fenilalaninamônialiase, cujo pico de atividades também ocorreu após 3h de eliciação (Gallão et al., submetido).

A mudança de resposta após coloração pelo AT, sugere uma forte diminuição de radicais aniônicos disponíveis nas substâncias pécticas (Cortelazzo et al., 1996), e/ou de uma deposição de lignina como resposta ao estresse provocado pela quitina. A diferença de comportamento se deve ao empilhamento de moléculas planares do corante no primeiro caso (coloração arroxeada), em contraposição à grande distância de radicais negativos existentes no material lignificado, com consequente distanciamento das moléculas do corante (coloração esverdeada).

A hipótese de que essa alteração do padrão de coloração identificado pelo AT seja devida à deposição de compostos fenólicos foi confirmada analisando os

resultados apresentados pela reação com a floroglucina, um método específico para identificação de lignina *in situ*. Os resultados apresentados podem ainda ser reforçados pelas análises realizadas com as enzimas fenilalaninamonialase e peroxidase, que são enzimas chave da via metabólica para a obtenção de fenilpropanóides e cuja atividade é aumentada após 3h de tratamento com quitina (Gallão et al., submetido). A adição de oligossacarídeos com atividade biológica em suspensões celulares têm revelado uma ativação de peroxidases e outras enzimas associadas a paredes celulares (Joseleau et al., 1995; Boudart et al, 1998).

Os polissacarídeos neutros presentes às paredes celulares não apresentaram alteração entre controle e material tratado, indicando que o hidrolisado de quitina não afetam esses açúcares de parede. Entretanto, o tratamento afetou o tamanho dos grãos de amido presentes no citoplasma das células, significativamente menores do que aqueles presentes no material controle. Apesar disso, não foram notadas diferenças significativas nas dosagens de amido, demonstrando a ocorrência de grãos menores e em maior quantidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Begnami & Cortelazzo (1996) para células cotiledonares de sementes de feijão submetidas ao envelhecimento acelerado. Esses autores sugerem que o fenômeno seja decorrente da ação enzimática e o relacionam com a perda de viabilidade dessas sementes.

Os vacúolos autofágicos observados no citoplasma das células tratadas com quitina, confirmam outros resultados obtidos para células de Citrus limon submetidas ao estresse (Piqueras et al., 1994). Nesse trabalho, os autores

sugerem que o fenômeno estaria relacionado com um aumento da atividade do metabolismo celular decorrido da resposta de defesa dessas células.

Células mantidas em suspensão têm uma tendência natural a formar agregados com até uma centena de células, como decorrência das contínuas divisões celulares por que passam. Com o envelhecimento, esses agregados tendem a se dissociar (Street et al., 1972). Uma série de alterações ultraestruturais são observadas na superfície das paredes celulares quando ocorre essa desagregação decorrente do envelhecimento (Ruel & Joseleau, 1993) e essas alterações podem ser aceleradas quando oligossacarídeos biologicamente ativos são adicionados ao meio de cultura (Hayashi et al., 1990, Ruel et al., 1995).

As alterações na superfície das paredes celulares em contato direto com o meio de cultura podem ser consideradas como consequência da solubilização do material não celulósico da parede, formando progressivamente uma rede fibrilar que acaba se separando em elementos fibrilares livres (McDougall & Fry, 1991). Essa hipótese é reforçada pela maior reatividade do material fibrilar com o acetato de uranila, sugerindo uma interação mais fácil do metal pesado com os grupos ácidos das pectinas, o que foi confirmado através da imunomarcagem de pectinas não metiladas (Ruel et al., 1995).

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os hidrolisados de quitina utilizados apresentam o mesmo efeito observado anteriormente para outros oligossacarídeos, antecipando um comportamento que ocorre com o envelhecimento. Isso pode ainda ser reforçado com o

comportamento sofrido pelos grãos de amido, também relacionados ao envelhecimento celular.

Outro fato a ser destacado se refere à rapidez com que a resposta é obtida (alterações são observáveis em microscopia fotônica a partir de 1h de incubação) e que após essa resposta rápida, a cultura adquire a capacidade de retornar às suas condições iniciais (8h de incubação), possivelmente pelo isolamento das células afetadas pelo oligossacarídeo, através de sua lignificação.

Literatura citada

- Begnami CN, AL Cortelazzo 1996 Cellular alterations during accelerated aging of French bean seeds. *Seed Sci Technol* 24: 295-303
- Boller T 1991 Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Mattoo AK & Suttle JC (eds) *The Plant Hormone Ethylene* (pp 293-314) CRC Press, Boca Raton, Florida
- Boudart G, L Calude, JP Bathe, D Frasez, MT Esquerré-Tugayé 1998 Differential elicitation of defense responses by pectic fragments in bean seedling. *Planta* 206:86-94.
- Boudet AM, C Lapiere, J Grima-Pettenati 1995 Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol* 129:203-236
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Carpita NC, DM Gibeaut 1993 Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3:1-30
- Clifford MN 1974 Specificity of acidic phloroglucinol reagents. *J Chromatogr* 94:321-324.
- Cortelazzo AL , Vidal BC 1991 Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. *Rev. Brasil. Bot.* 14:27-33.

- Cortelazzo AL 1992 Starch detection and dosage in Canavalia ensiformis and C. gladiata cotyledons, during the plantlet development. Rev Bras Bot 15:157-162.
- Cortelazzo AL, MF Marais, JP Joseleau 1996 Changes in peroxidases in the suspension culture of Rubus fruticosus during growth. Plant Cell Tis & Org Cult 46:27-33.
- Fry SC 1986 Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annu Rev Plant Physiol 37:165-186.
- Funk C, P Brodelius 1990 Influence of growth regulators and elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of Vanilla planifolia. Phytochem 29:845-848.
- Gotthardt AG, HJ Grambow 1992 Near-isogenic wheat suspension cultures: establishment, elicitor induced peroxidase activity and potential use in the study of host/pathogen-interactions. J Plant Physiol 139:659-665.
- Graham TL, MY Graham 1991 Cellular coordination of molecular responses in plant disease. Molec Plant-Mic Interact 4:415-422.
- Hayashi T, K Yoshida, C Ohsumi 1990 Regeneration of colchicine-induced single carrot cells. Agric Biol Chem 54:1567-1568.
- Joseleau, J.P., Cortelazzo, A.L., Chambat, G., Ruel, K. 1996 Activation of peroxidases from plant cell suspensions by xyloglucan oligosaccharide elicitors. Plant Peroxidase Newsletter 8: 8-13.

- Iiyama K, TBT Lam, PJ Meikle, DI Rhodes, BA Stone 1993 Cell wall biosynthesis and its regulation. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J (eds) Forage cell wall structure and digestibility. Am Soc Agronomy, Madison, pp 621-683.
- McCready RM, J Guggolz, V Silveira, HS Owens 1950 Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical Chemistry, Washington, 22:1156-1158.
- McDougall GJ, SC Fry 1991 Xyloglucan nonasaccharide, a naturally occurring oligosaccharin, arises in vitro by polysaccharide breakdown. J. Plant Physiol. 137: 332-336.
- McGhie TK, NP Masel, D Maclean, BJ Croft, GR Smith 1997 Biochemical responses of suspension-cultured Sugarcane cells to an elicitor derived from the root pathogen Pachymetra chaunorhiza. Aust J Plant Physiol 24:143-149.
- Murashige T, DPH Tucker 1969 Growth factor requirements of Citrus tissue culture. – In: Proc. First Int. Citrus Symp. Vol III (H.D. Chapman, ed.), pp. 1155-1161, Univ. of California, Riverside.
- Pearce RB, JP Ride 1982 Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. Physiol Plant Pathol 20:119-123.
- Piqueras A, E Olmos, E Hellín 1994 Cytological changes related with salt tolerance in embryogenic callus of Citrus limos. Plant Cell Tis & Org Cult 39:13-18.
- Ren Y., West C.A 1992 Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (Oryza sativa L.) by chitin. Plant Physiol 99:1169-1178.

- Ruel K, AL, JP Joseleau 1993 Influence of xyloglucan oligosaccharides on the micromorphology of the walls of suspension-cultured Rubus fruticosus cells. Acta Bot Neerl 42:363-378.
- Ruel K, AL Cortelazzo, G Chambat, A Faïk, MF Marais, JP Joseleau 1995 Rapid wall surface rearrangements induced by oligosaccharides in suspension-cultured cells. Current Issues in Plant Mol and Cell Biol 445-455.
- Silva TRG, AL Cortelazzo, SMC Dietrich 1997 Cytological aspects of storage mobilization in seeds of Dalbergia miscolobium during germination and plantlet growth. Ciênc Cult, 49: 219-222.
- Spurr AR 1969 A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26: 31-43.
- Street EM, MR Davey, B Sutton-Jones 1972 Ultrastructure of plant cells growing in suspension culture. Symp Biol Hung 14:145-159.
- Trevisan MTS, JJC Scheffer, R Verpoorte 1997 Effect of elicitation on the peroxidase activity in some cell suspension cultures of hop, Humulus lupulus. Plant Cell Tis & Org Cult 48:121-126.
- Vallet C, B Chabbert, Y Czaninski, B Monties 1996 Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. Ann Bot 78: 625-632.
- Vance CP, TK Kirk, RT Sherwood 1980 Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann Rev Phytophatol 18:259-288.
- Vander P, KM Varum, A Domard, NEE Gueddari, BM Moerschbacher 1998 Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and

chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol* 118:1353-1359.

Vidal BC 1977 Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Mol Biol* 22:45-64.

Villegas M., P.E. Brodelius 1990 Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* 78:414-420.

Wallace G, Fry SC 1994 Phenolic components of the plant cell wall. *Inter Rev Cytol* 151:229-267.

Walter MH 1992 Regulation of lignification in defense. In: Boller T, Meins F (eds) *Genes involved in plant defense*. Springer, Wien, pp 327-352.

Legendas

Figura 1: Cortes de células de Citrus aurantium cultivadas em suspensão. 1A e 1B: Reação com floroglucina. 1A: material controle; 1B: células após 3h de incubação. Nota-se uma resposta positiva ao método nas paredes celulares. 1C e 1D: Reação do PAS. As paredes celulares e os grãos de amido (➡) apresentam-se intensamente corados. 1C: controle; 1D: células após 3h de incubação. 1E e 1F: Micrografias eletrônicas de células tratadas com solução de quitina. Pode ser visualizada a eucromatina e o nucléolo bem evidentes; 1E: material após 2 horas de incubação, mostrando cromatina mais condensada próxima a região do envoltório nuclear; 1F: material com 6 horas de incubação; além do núcleo (n) e nucléolo (nu) mais frouxo, notam-se inúmeros vacúolos (v), mitocôndrias (m) e grãos de amido (➡) no citoplasma das células. Barras: A, B: 47 µm; C, D: 14 µm; E, F: 4 µm

Figura 2: Micrografias eletrônicas de cortes de células de Citrus aurantium cultivadas em suspensão. Paredes celulares (cw), mitocôndrias (m); vacúolos (v) ribossomos (➤). 2A: material controle. 2B: material após 2 horas de incubação. 2C e 2D: material com 6 h de incubação, mostrando vacúolos autofágicos (av). 2E: material tratado com 8 horas de incubação, mostrando vesícula de secreção (sv). 2F: material controle mostrando parede celular íntegra e com aspecto fibrilar

característico. 2G-J: material tratado, apresentando parede celular com diferentes graus de desagregação de suas fibrilas (→). 2G-2H: material com 2 horas de incubação. 2I: material com 3 horas de incubação. 2J: material tratado com 8 horas de incubação. Barras: A: 2 μm ; B, C, E, G, I, J: 0,3 μm ; D, F, H: 0,5 μm .

Figura 3: Diagrama esquemático mostrando a quantidade de grãos de amido por célula de C. aurantium controle e tratada com hidrolisado de quitina. Para 3 horas de eliciação e seu respectivo controle, foram contadas 40 células de cada material.

Tabela 1. Métodos de coloração utilizados e estruturas coradas nas células de *Citrus aurantium*

Estrutura	Controle	Trat. (1h)	Trat. (2h)	Trat. (3h)	Trat. (4h)	Trat. (6h)	Trat. (8h)
Paredes celulares							
Açúcares ácidos	AT: +++	AT: +++	AT: ++	AT: +	AT: ++	AT: +++	AT: +++
Metacromasia	AT: +++	AT: ++	AT: +	AT: -	AT: +	AT: ++	AT: +++
Açúcares neutros	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++
Citoplasma							
Corpos proteicos	XP: ++	XP: +	XP: +	XP: +	XP: +	XP: ++	XP: ++
	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++
	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -
Grãos de amido	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++
	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -
Reação para a Floroglucina							
	-	+	++	+++	++	+	-

AT: Azul de Toluidina em pH 4,0; PAS: método do PAS (ácido periódico, reativo de Schiff); XP: xylidine ponceau em pH 2,5. - não corado; + pouco corado; ++ corado; +++ intensamente corado.

Tabela 2. Resultados das dosagens de proteína e amido em *C. aurantium* expressos em mg/g de células liofilizadas

time (h)	Amido		Proteína	
	Controle	Quitina	Controle	Quitina
1	359 ± 39a*	231 ± 5b	18 ± 3a	11 ± 4a
2	204 ± 29a	249 ± 20a	19 ± 6a	19 ± 3a
3	297 ± 6a	324 ± 16a	6 ± 5a	13 ± 5a
4	370 ± 11a	271 ± 29b	23 ± 4a	20 ± 5b
6	279 ± 3b	301 ± 9b	20 ± 3a	19 ± 6a
8	285 ± 3b	277 ± 61b	25 ± 4a	18 ± 5a

*Letras iguais em uma mesma linha para amido e proteína indicam resultados sem diferença significativa a $P < 0,05$.

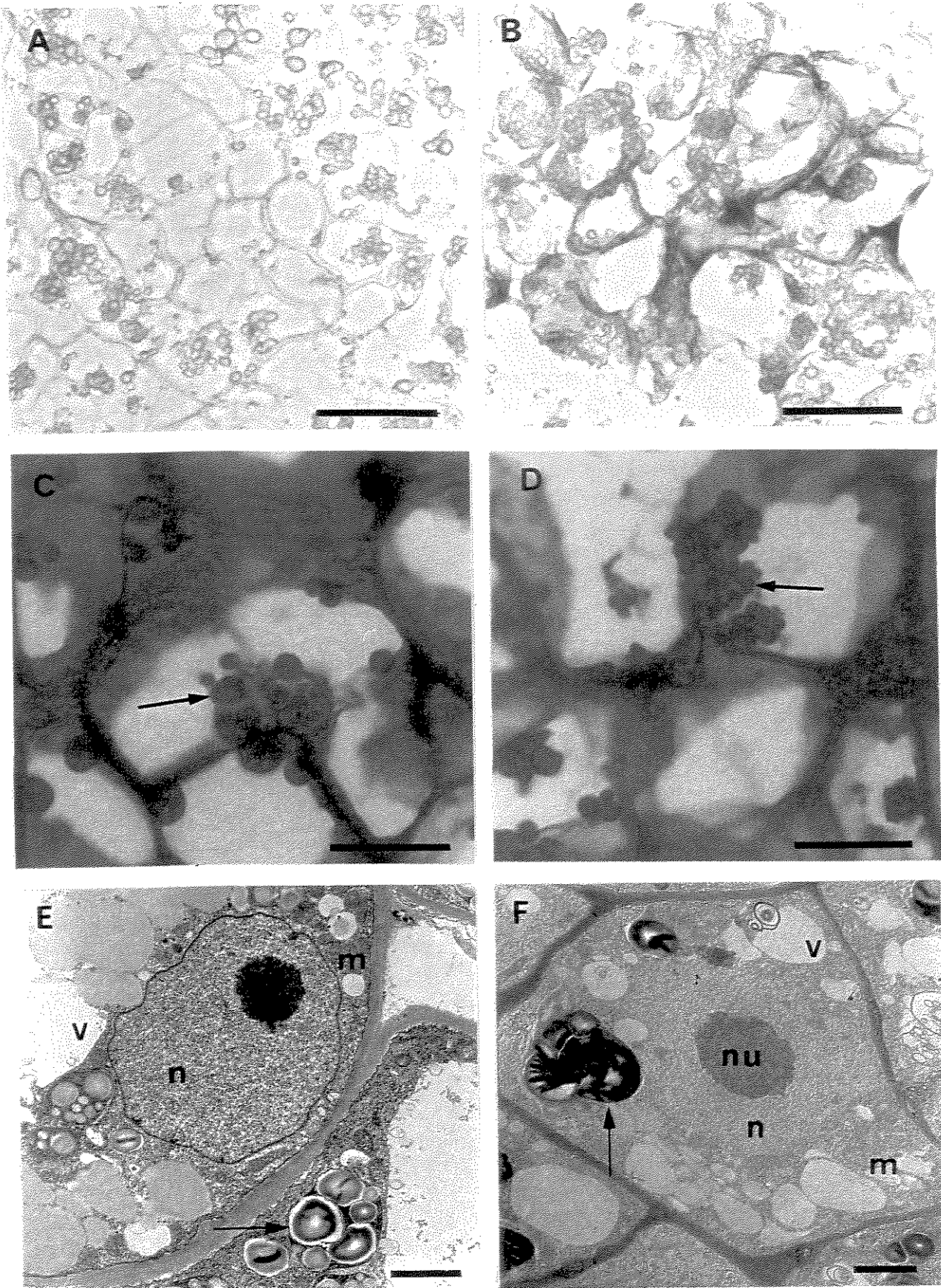


Figura 1

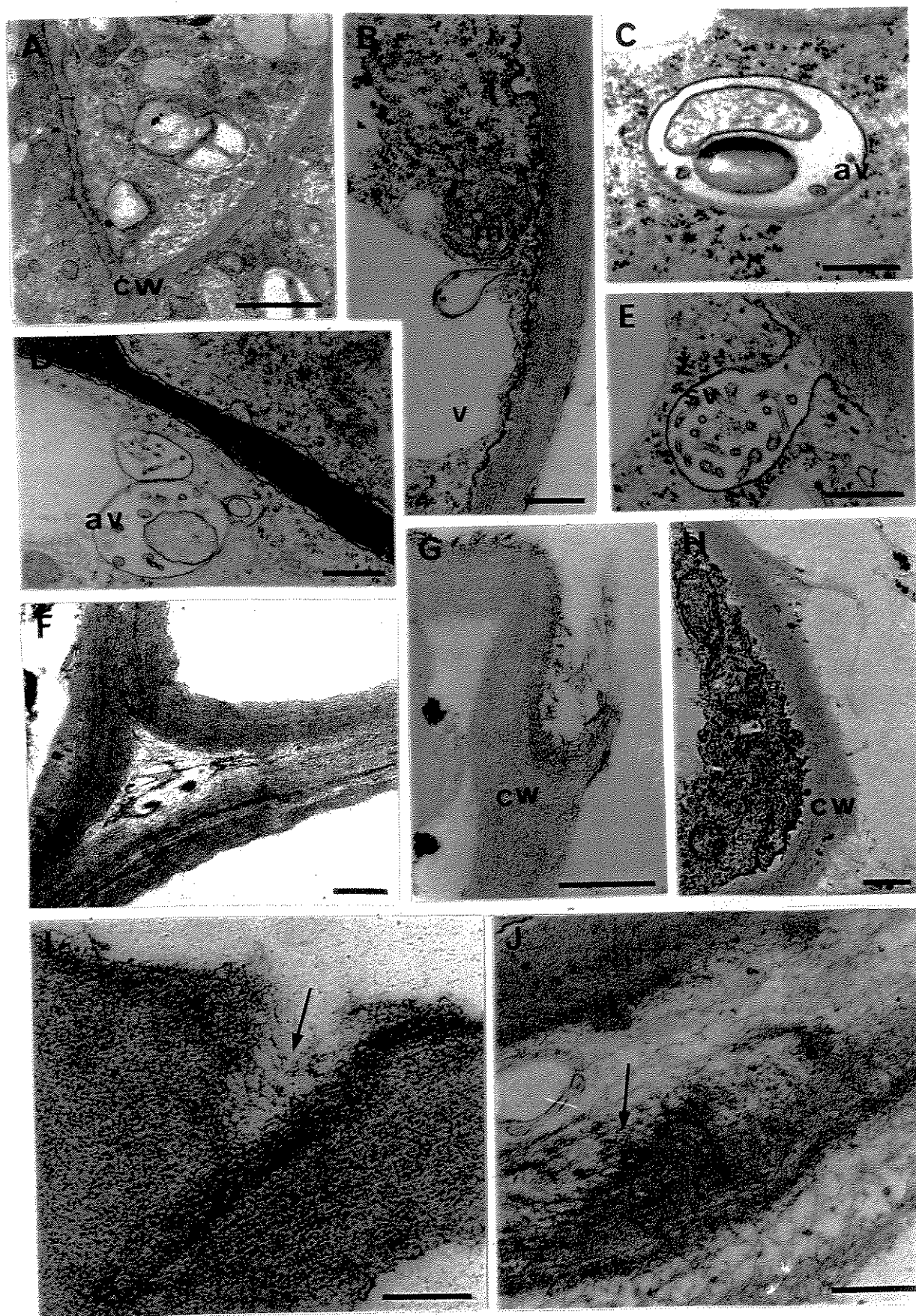


Figura 2

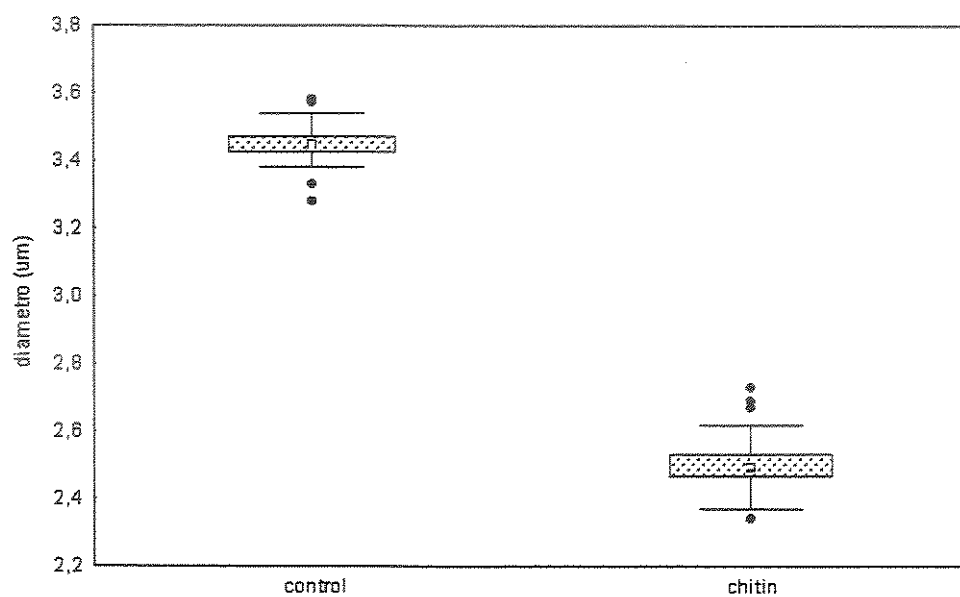


Figura 3

6. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

**Biochemical responses to chitin in suspension-
cultured sugarcane cells**

Biochemical responses to chitin in suspension-cultured sugarcane cells

M.I. Gallão¹, E.S. Brito¹, M.P. Fevereiro² and A.L. Cortelazzo^{1*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 13081-970, SP, Brasil; ² Laboratório Biotecnologia de Células Vegetais, Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB-UNL), Apartado 127, Oeiras P-2780, Portugal

* Author for correspondence: Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). CP 6109, Campinas, 13081-970, São Paulo, Brasil.

Telefone: (55 19 788-7786)

FAX: (55 19 788-7821)

e-mail: angelo@obelix.unicamp.br

Running head: Responses to chitin in sugarcane cells

Abstract

Peroxidases (EC.1.11.1.7) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (EC.4.3.1.5.) are involved in the synthesis phenylpropanoid and have an important role in protecting plants from damage by biotic and abiotic factors, possibly through the production of lignin and phytoalexin. Chitin fragments (final conc. of 10^{-9} M) were added to cell suspension cultures of sugarcane and extracellular peroxidases and PAL were analyzed 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h later. Peroxidase activity was maximal after 4 h and then decreased progressively in the remainder after experiment. Acid peroxidases were elicited more strongly than basic peroxidases. In contrast, PAL activity increased throughout the whole incubation period. These results show that chitin oligomers can stimulate a defense response in sugarcane cells

Keywords: chitin, elicitation, peroxidase, PAL, sugarcane, tissue culture.

Introduction

Plant cells can respond to pathogenic attacks by activating a series of defense reactions (Ride 1992; Boller 1995). The defense system of plants includes biochemical mechanisms such as the accumulation of phenolic compounds linked to the cell wall, the synthesis of phytoalexin, the activation of enzymes involved in lignification, the synthesis of hydrolytic enzymes as chitinases and β -1,3-glucanases, and the formation of the cell wall structural proteins, including hydroxyproline-rich glycoproteins (Dixon et al. 1994). Phenylpropanoids, whose metabolism may be initiated by the activation of enzymes that participate in initial defense reactions, are important for the survival of cells under stress (Dixon and Paiva 1995).

Chitin, a cell wall polysaccharide from fungi, is an active elicitor of lignification in wounded wheat leaves and wheat suspension-cultured cells (Gotthardt and Grambow 1992).

Peroxidases (EC.1.11.1.7) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (EC. 4.3.1.5.) are among the enzymes activated in response to a stress caused by fungi. Peroxidases are widely distributed in the plant kingdom and are associated with several physiological processes, including growth regulation and cellular elongation (Goldberg et al. 1986), auxin metabolism (Grambow and Langenbeck-Schwich 1983) and lignification (Melo et al. 1995). Electrophoresis, ion exchange chromatography and isoelectric focusing were applied to different plant extracts and revealed the presence of acid and basic peroxidases. Each different in

proportions, depending on the techniques used for their separation (Gaspar et al. 1985).

PAL is a key enzyme in phenylpropanoid metabolism and its synthesis can be induced in response to elicitors such as infections, wounds and illumination (Dixon et al. 1992, Parvez et al. 1997). PAL catalyzes the first reactions of the phenylpropanoid biosynthetic pathway involving the conversion of L-phenylalanine into *trans*-cinnamic acid through a non-oxidative deamination reaction.

Lignin deposition can be induced in many cell types by diseases or wounds, indicating that the genes involved in their biosynthesis respond to developmental and environmental stimuli (Dixon et al. 1994). This process can be analysed using plant cell cultures in which the cells are stimulated by substances known to induce lignin deposition.

In this work, we investigated the changes in peroxidase and PAL activities in Saccharum officinarum cells cultivated in suspension and exposed to chitin oligosaccharides.

Materials and Methods

Plant material

S. officinarum cells derived from calluses were sub-cultured every 2-3 weeks into Murashige and Skoog medium (MS) (Murashige and Skoog 1962) containing 3 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenocetic acid (2,4-D) (MS₃), at 25 ± 1° C. Cell suspensions were initiated by transferring portions of callus to 20 mL of liquid medium in the dark followed by incubation in a shaker at 120 rpm.

Elicitation assay

The chitin solution was prepared as described by Villegas and Brodelius (1990) and added to the S. officinarum cultures, to a final concentration of 10⁻⁹ M for 1, 2, 3, 4, 6 and 8 hours. The control cultures received sterile distilled water as the elicitor. These experiments were repeated three times.

Proteins

The protein content of the culture medium (µg mL⁻¹) and the cell extracts (mg g⁻¹ dry weight) was determined by the Bradford dye-binding technique (Bradford 1976) using Bovine Serum Albumin (Sigma) as standard.

Peroxidase activity

The peroxidase activity was assayed spectrophotometrically through the oxidation of guaiacol. The reaction mixture contained 5 mM guaiacol and 0.5 mM hydrogen peroxide in 25 mM phosphate buffer (pH 6.5) and the activity was expressed in U mL⁻¹, using and $\epsilon_{470\text{nm}} = 26.6$ for tetraguaiacol (George 1953).

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity

Lyophilized material (0.3 g) was homogenized in liquid nitrogen and then mixed with 6 mL of ice-cold 0.5 M borax-borate buffer (pH 8.8) followed by centrifugation for 30 min at 17000 g and 4° C. The resulting supernatant was filtered (5 µm) and used in the enzyme assay. Five hundred microliters of extract were added to 1900 µL of borax-borate buffer and 600 µL of 0.1 M L-phenylalanine solution, and then incubated at 37° C. The change of absorbance at 290 nm between 15 min and 75 min after enzyme addition was used to calculate the PAL activity (Dörnenburg and Knorr 1997).

Isoelectric focusing of the peroxidases from culture medium

Isoelectric focusing was done using a Phast System system and Phast Gel IEF 3-9 (Pharmacia). The protein bands were detected by silver staining. Peroxidase bands were detected by incubating the gels in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 25 mM guaiacol in the presence of 1 mM H_2O_2 (Melo et al. 1995).

Results and discussion

Chitin and chitosan occur in the cell walls of many fungi (Bartnicki-Garcia 1968) and oligosaccharide fragments of both compounds elicit defense-related responses in various plants. Fragments of chitosan and chitin induce defense-related lignification of the cell walls in suspension-cultured slash pine (Lesney 1990), potato suspension cultures (Dörnenbrug and Knorr 1997) and wheat leaves (Vander et al. 1998). As a result, elicitation can produce different cell alterations through protein synthesis.

The concentration of soluble protein in the culture medium increased from 12 mg.mL⁻¹. From the beginning of the experiment to 30 mg.mL⁻¹ after 8 h, no significant differences were found between the control and chitin-treated (Fig. 1a). The protein levels in the cellular extracts were around 30-40 mg.g⁻¹ of dry matter (Fig. 1b), indicating no alterations in the total amount of those molecules, regardless of chitin addition.

Peroxidases are able to modify cell wall properties (Fry 1986) since they can catalyse the cross-linking of extensin and pectin (Brett and Waldron 1990). The accumulation of H₂O₂ from an elicitor-induced oxidative burst directs the cross-linking of cell wall structural proteins (Levine et al. 1994).

The activity of the peroxidase isozymes in the culture medium increased with the length of exposure (Fig. 1c), in a manner similar to that reported for Rubus

fruticosus suspension-cultured cells in the growth phase (Cortelazzo et al. 1996). The addition of water (control) produced a similar response to that seen with chitin oligosaccharide fragments, and may indicate a stress response of the cells to culture manipulation, to change in gas phase or to dilution of the medium (Trevisan et al. 1997).

A significant difference between the peroxidase activities in the control and chitin-treated cultures was seen only at 4 h after stimulation (Fig. 1c). In some species, such as spruces, extracellular peroxidase activity is not enhanced by elicitor compounds (Messner and Boll 1994). Increases in peroxidase activity may confer resistance to fungal attack by increasing cell wall lignification, by producing biotoxic hydrogen peroxide and by contributing to the propagation of stress signals, thus leading to an increased intensity of the plant defense (McGhie et al. 1997).

Figure 1d shows the increase in PAL activity in suspension cultures of sugarcane cells 4, 6 and 8 h after exposure to chitin. A similar increase also occurred in the control cells. The biosynthesis of the phenylpropanoid precursors is controlled partly by PAL. The activity of this enzyme increased dramatically in sugarcane cell cultures treated with chitin oligomers. An increase in PAL activity is related to lignification in elicited pine cell cultures (Campbell and Ellis, 1992) and in potato cell cultures treated with chitosan (Dörnenburg and Knorr 1997).

Figure 2 shows the peroxidase isoenzyme patterns for suspension-cultured sugarcane cells after 4, 6 and 8 h of cultivation. Elicited and non-elicited cultures had acidic isoenzymes. All elicited and non-elicited cultures showed an increased intensity in a band with a pI of 6.55. Changes in the activities of peroxidase

isoenzyme as a consequence of various types of stress or variations in the physiological conditions are well documented, and sequential relationships between cationic and anionic isoenzymes have been demonstrated (Gaspar et al., 1991). The main isoenzyme present in the culture medium of tomato cells adapted to grow in the presence of NaCl was acidic (Sancho et al., 1996), as was also reported for cell suspensions of Acer pseudoplatanus (Sterjiades et al., 1993) and tobacco (Schlob et al, 1987).

Anionic peroxidases are often associated with lignification and suberization (Goldberg et al., 1986), and we have observed lignin deposition in suspension cultures of sugarcane cells (unpublished observations). The increased PAL activity detected here reinforces these observations, since this enzyme is important in lignin biosynthesis.

Acknowledgements

We wish to thank to Coopersucar for calluses of Saccharum officinarum and Capes/PICDT-Brazil for supporting M.I. Gallão.

References

Bartnicki-Garcia S (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* 22:87-108

Boller T (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:189-214

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Brett C and Waldron K (1990) In: Black M, Chapman J (eds) *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Unwin Hyman London. pp 193

Campbell MM, Ellis BE (1992) Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. I. Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta* 186:409-417

Cortelazzo AL, Marais MF, Joseleau JP (1996) Changes in peroxidases in the suspension culture of Rubus fruticosus during growth. *Plant Cell Tissue & Organ Cult.* 46: 27-33.

Dixon RA, Choudhary AD, Dalkin A, Edwards R, Fahrendorf T, Gowri G, Harrison MJ, Lamb CJ, Loake GJ, Maxwell CA, Orr J, Paiva NL (1992) Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In:

Stafford HA, Ibrahim RK (ed) Phenolic metabolism in plants. Plenum Press, New York, pp 91-138

Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* 32:479-501

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097

Dörnenburg H, Knorr D (1997) Evaluation of elicitor- and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (Solanum tuberosum) suspension cultures as a model system for plant tissues. *J Agric Food Chem* 45:4173-4177

Fry SC (1986) Cross linking of matrix polymers in the growing cell walls of Angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol* 37:165-166

Gaspar T, Penel C, Castillo FJ and Greppin H (1985) A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant* 64:418-423

Gaspar TH, Penel C, Hagege D and Greppin H (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation, and development processes. In: Lobarzewski J, Greppin H, Penel C, Gaspar TH (eds) Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, pp 249-280

George P (1953) Intermediate compound formation with peroxidase and strong oxidizing agents. *J Biol Chem* 201:413-451

Goldberg R, Imberty A, Chu-Ba J (1986) Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry* 25:1271-1274

Gotthard U, Grambow HJ (1992) Near-isogenic wheat suspension cultures: establishment, elicitor induced peroxidase activity and potential use in the study of host/pathogen-interactions. *J Plant Physiol* 139:659-665

Grambow HJ and Langenbeck-Schwich (1983) The relationship between oxidaseactivity, peroxidase activity, hydrogen peroxidase and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. *Plant* 157:131-137

Lesney MS (1990) Effect of 'elicitors' on extracellular peroxidase activity in suspension-cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) *Plant Cell Tiss Org Cult* 20:173-175

Levine A, Tenhaken R, Dixon RA and Lamb CJ (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease response. *Cell* 79:583-593

McGhie TK, Masel NP, Maclean D, Croft BJ, Smith GR (1997) Biochemical responses of suspension-cultured sugarcane cells to an elicitor derived from the root pathogen *Pachymetra chaunorhiza* Aust. *J Plant Physiol* 24:143-149

Melo NS, Cabral JMS, Fevereiro MP (1995) Extracellular peroxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. Purification and characterization of two cationic enzymes. *Plant Sci* 106:177-184

Messner B and Boll M (1994) Cell suspension cultures of spruce (Picea abies): inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). *Plant Cell Tiss Org Cult* 39:69-78

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Parvez MM, Wakabayashi K, Hoson T, Kamisaka S (1997) White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. *Physiol Plant* 99:39-48

Ride JP (1992) Recognition signals and initiation of host responses controlling basic incompatibility fungi and plants. *Soc Exp Biol Semen Sci* 48:213-237

Sancho MA, Forchetti SM, Pliego F, Valpuesta V, Quesada MA (1996) Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. *Plant Cell Tissue Org Cult* 44:161-167

Schlob P, Walter C, Mäder M (1987) Basic peroxidases in isolated vacuoles of Nicotiana tabacum L. *Planta* 170:225-229

Sterjiades R, Dean JFD, Gamble G, Hemmelsbach DS, Eriksson KEL (1993) Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (Acer pseudoplatanus) cell-suspension cultures. *Planta* 190:75-87

Trevisan MTS, Scheffer JJC, Verpoorte R (1997) Effect of elicitation on the peroxidase activity in some cell suspension cultures of hop, Humulus lupulus. *Plant Cell Tis & Org Cult* 48:121-126.

Vander P, Varum KM, Domard A, Gueddari NEE and Mourschbacher BM (1998) Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol* 118:1353-1359

Villegas M, Brodelius PE (1990) Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures. *Physiol Plant* 78:414-420

Legends

Fig. 1. a) Protein levels in the culture medium from Saccharum officinarum cell suspensions treated with chitin (■) or sterile distilled water (controls □). b) Protein levels in extract of cells treated with chitin (■) or water (□). c) Peroxidase activity in the culture medium from suspension-cultured S. officinarum cells treated with chitin (■) or water (□). d) PAL activity in the culture medium from suspension-cultured cells S. officinarum treated with chitin(■) or water (□). The columns represent the mean $\pm$ S.D.

Fig. 2. Effects of chitin on the activity of isoforms of extracellular peroxidase from in suspension-cultured sugarcane cells

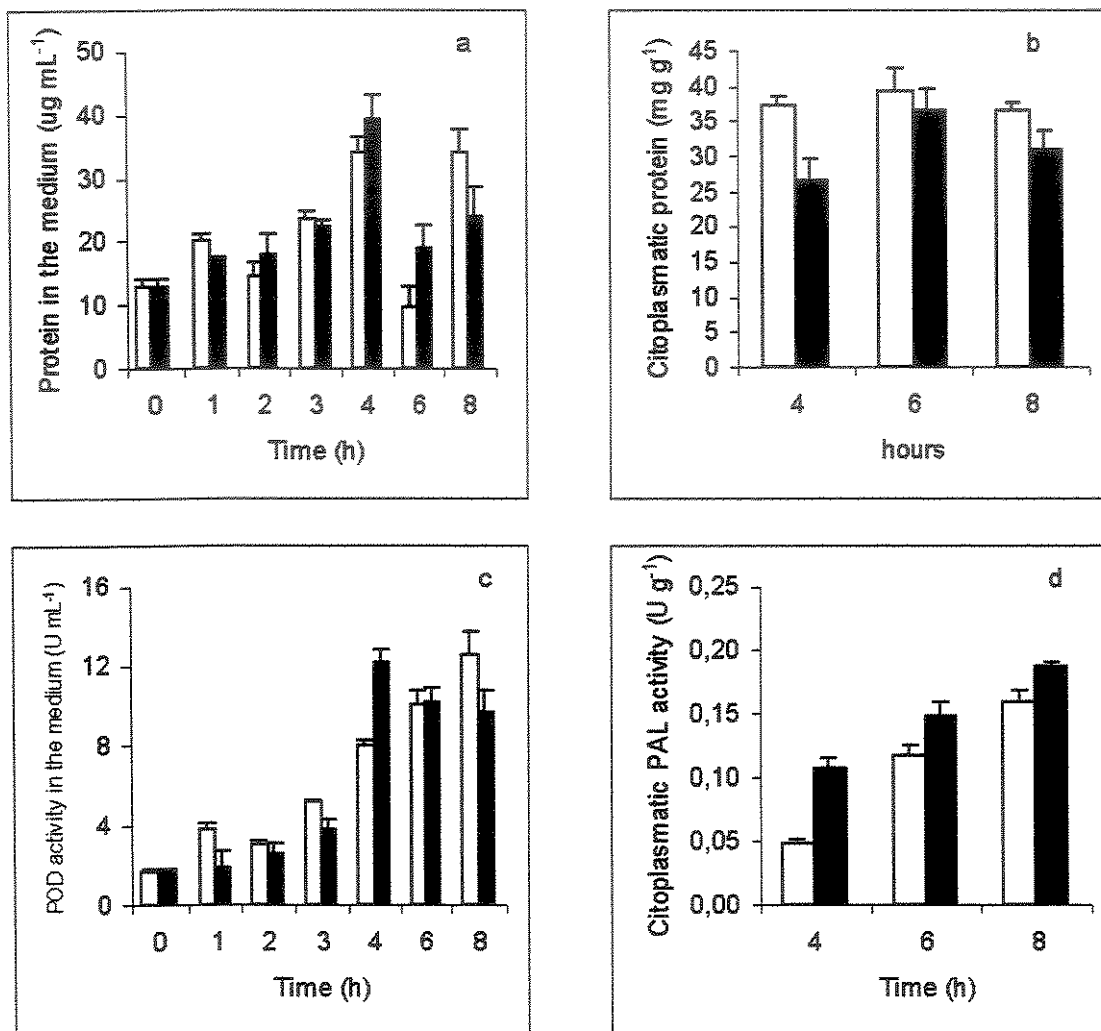


Figure 1

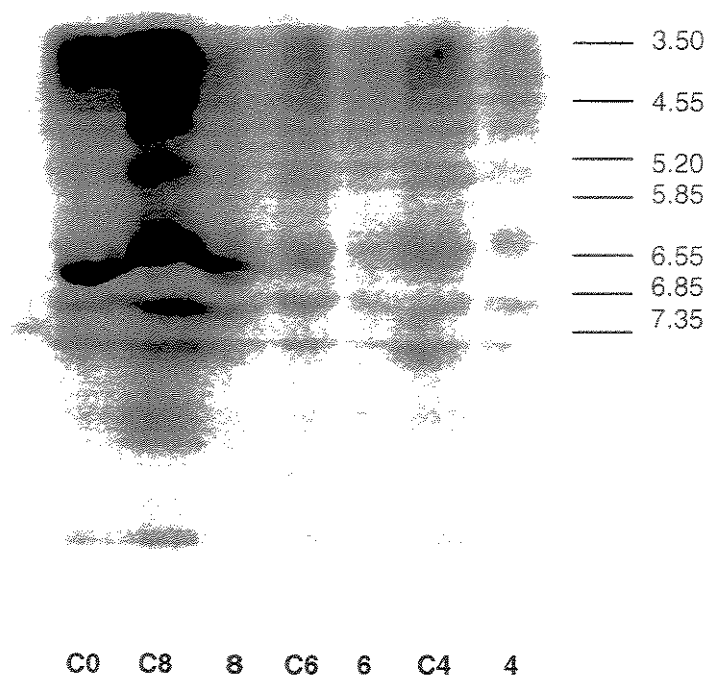


Figure 2

7. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO:

“Indução de alterações morfológicas provocadas por hidrolisado de quitina em células de cana-de-açúcar cultivadas em suspensão”

Indução de alterações morfológicas provocadas por hidrolisado de quitina em células de cana-de-açúcar cultivadas em suspensão

Maria Izabel Gallão^{1,2} & Angelo Luiz Cortelazzo³

Universidade Estadual de Campinas – Unicamp

Departamento de Biologia Celular, Caixa Postal: 6109

13081-970 – Campinas – Brasil

¹Parte da tese de doutorado de M.I. Gallão

²Endereço permanente: Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba – CEP 58071-001– João Pessoa – PB

³Autor a quem a correspondência deve ser encaminhada

Resumo

Células de Saccharum officinarum quando submetidas a hidrolisados de quitina responderam produzindo material fenólico. Essas alterações puderam ser observadas através de colorações citoquímicas para constituintes da parede celular, como o azul de toluidina e a floroglucina. O primeiro corante detecta açúcares ácidos e o segundo compostos fenólicos. Além das alterações de parede foram observadas mudanças no padrão nuclear das células tratadas, visualizadas através da microscopia de luz ou eletrônica. A reação de Feulgen possibilitou uma medição da área nuclear que teve um aumento de 96% no material incubado durante 6h em solução de quitina, em relação ao controle. Em termos ultraestruturais, foram observadas regiões com cromatina mais compactada e com nucléolos em processo de degeneração para as células tratadas. Finalmente, foram observadas desagregação de polissacarídeos nas regiões mais externas das paredes celulares, confirmando resultados obtidos com a utilização de outros oligossacarídeos em diferentes materiais vegetais.

Palavras chave: Eliciação; quitina; suspensões celulares; cana-de-açúcar; lignificação.

Introdução

A célula vegetal possui mecanismos de defesa contra fatores abióticos e bióticos (Hawkins & Boudet 1996). Uma das respostas ao ataque de patógenos é a lignificação (Vance et al. 1980), evento que conta com a participação da fenilalaninamoniolase (PAL) e das peroxidases (Pox), cujas atividades servem como indicadores das respostas celulares das plantas ao estresse (McGhie et al. 1997).

A lignina é um polímero polifenólico heterogêneo complexo que resulta da copolimerização desidrogenativa dos álcoois *p*-coumarílico (hidroxibenzoil), coniferílico (guaiacil) e sinapílico (siringil) em proporções diversas (Grima-Pettenati & Goffner 1999)

Além da lignificação, outras alterações celulares, como por exemplo a produção de fitoalexinas, vêm sendo observadas quando substâncias com atividade biológica são adicionadas a suspensões de células em desenvolvimento. Dentre as substâncias mais estudadas, alguns oligossacarídeos têm demonstrado atividade eliciadora de diferentes respostas pelas células sendo denominados oligossacarinas. Esses oligossacarídeos podem ser obtidos a partir de xiloglicanos (Joseleau et al. 1996, McDougall & Fry 1990), de pectinas (Aldington et al. 1991) e de quitina e quitosana, polímeros presentes no exoesqueleto de insetos, outros invertebrados e parede celular de fungos (Peltonen et al. 1997).

Os efeitos das oligossacarinas têm sido detectados nas atividades de enzimas associadas ao metabolismo da lignina (Peltonen et al. 1997, Joseleau et al. 1996) ou das paredes celulares. Entretanto, os trabalhos referentes às

alterações morfológicas provocadas pelos mesmos ainda são escassos, principalmente aqueles relativos aos aspectos ultra-estruturais.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar as alterações morfológicas que ocorreram em células de S. officinarum quando cultivadas em suspensão, na presença de hidrolisado de quitina.

Material e Métodos

Material Vegetal - Foram utilizadas suspensões celulares de Saccharum officinarum L., originadas a partir de calos transferidos para 20 mL de meio de cultura Murashige e Skoog (1962) contendo 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) à 25 ± 1° C, no escuro e sob agitação constante de 120 rpm.

Ensaio de eliciação - 1g de quitina, obtida de casca de caranguejo, foi dissolvida em 35 mL de água destilada. Essa mistura foi aquecida a 90°C por 30 minutos e em seguida o pH foi ajustado para 5,0 com HCl concentrado, o volume final da solução foi ajustado para 50 mL e autoclavado a 121°C por 30 minutos (Villegas & Brodelius, 1990). Esse hidrolisado foi adicionado nas culturas de S. officinarum a uma concentração final de 200 µg/mL. Aos controles foi adicionada água destilada estéril ao invés do eliciador. Os períodos de tratamento foram de 4, 6, e 8 horas com seus respectivos controles. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Análises estruturais e ultra-estruturais

Métodos citoquímicos - As suspensões foram filtradas em funil de vidro (porosidade 40-90 µm) e fixadas em solução de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 0,1% em tampão fosfato 50mM, pH 7,0 por 4 horas à 4 °C. A desidratação foi feita em soluções de etanol e a diafanização em xilol por 30

minutos, seguindo-se embebição em parafina e cortes seriados com 7 μm de espessura. Após remoção da parafina e reidratação, parte do material foi corado com Azul de Toluidina (AT) 0,025% ($\lambda_{\text{max}} = 620\text{-}630\text{ nm}$) em tampão McIlvaine, pH 4,0 para detecção de radicais aniônicos e metacromasia ($\lambda_{\text{max}} < 580\text{-}590\text{ nm}$) (Vidal 1977). Para a detecção de polissacarídeos neutros foi realizada a reação do PAS, segundo Cortelazzo (1992). Finalmente, para a detecção de lignina, foi utilizada a reação da floroglucina/HCl (Vallet et al. 1996).

Reação de Feulgen - A reação de Feulgen foi realizada segundo Mello & Vidal (1978). No material corado foram realizadas 40 medidas do diâmetro dos núcleos do material controle e tratado com quitina após 6 horas (Cortelazzo 1992). O tamanho dos núcleos foi calculado com um limite de confiança de 5%.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) - As células foram fixadas por 18 horas em solução contendo glutaraldeído 2,5%, sacarose 3% e CaCl_2 5 mM em tampão fosfato pH 7,2, à 4 $^{\circ}\text{C}$, seguindo-se diversas lavagens em tampão e pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% tamponado. A desidratação foi feita em acetona e a inclusão em resina Spurr (1969). Os cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,2% e as observações foram feitas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss, Leo 906), a 80 kV.

Análises bioquímicas

Extração e dosagem de carboidratos - Realizaram-se em triplicata, a partir de 25 mg de células liofilizadas. Para a extração do amido colocou-se o material em 5 mL de metanol, clorofórmio e água (MCA) 12:5:3 v/v/v, submetendo-o a duas centrifugações a 4.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante, contendo os açúcares livres, foi guardado e ao precipitado foi acrescentado 5 mL de etanol 10% e feita nova centrifugação. A seguir o sobrenadante foi guardado e ao precipitado foi adicionado 5 mL de ácido perclórico 30% (PCA) e centrifugado duas vezes a 4.000 g durante 10 minutos. As dosagens de açúcares livres, polissacarídeos solúveis em água e amido foram feitas segundo o método da antrona (McCready et al. 1950). Os valores foram expressos em mg de amido por grama de peso seco. As análises foram realizadas em triplicata.

Estatística - Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, sendo calculada a diferença mínima significativa (DMS) a 5%.

Resultados

Os resultados obtidos nas diversas colorações são apresentados na tabela 1. A presença de açúcares neutros no material controle e tratado apresentou a mesma intensidade de coloração. A reação do PAS revelou no material controle uma forma mais regular das células (fig. 1A) enquanto que em 6 horas foi observada uma maior heterogeneidade, com muitas células alongadas (fig. 1B).

A coloração pelo AT apresentou-se constante para os diferentes materiais, à exceção daquele com 6 horas de incubação, onde ela foi menor (Tabela 1), com uma maior quantidade de material ortocromático (corado em verde). Não foi observada reação positiva para a floroglucina (fig. 1C) no material controle, seguindo-se uma progressiva resposta positiva ao método até 6 horas de incubação (fig. 1D) que voltou a diminuir após 8 horas.

As células controle quando coradas pela reação de Feulgen revelaram a presença de núcleos significativamente menores, com $9,18 \pm 1,5 \mu\text{m}$ (fig. 1E) em relação as células tratadas pela quitina. Essas células, após 4 horas de incubação, apresentaram núcleos com $11,2 \pm 2,5 \mu\text{m}$ de diâmetro, passando para $11,3 \pm 2,2 \mu\text{m}$ após 6 horas (fig. 1F). Após 8 horas de incubação, as áreas obtidas retornaram a valores estatisticamente iguais aos do material controle $8,69 \pm 1,9 \mu\text{m}$ (Tabela 2).

Os cortes obtidos para a microscopia eletrônica não apresentaram praticamente nenhuma estrutura citoplasmática. Os núcleos do material controle

submetido ao hidrolisado de quitina, foram observadas regiões com a cromatina mais condensada e nucléolos em degeneração (figs. 2B-C).

As paredes das células do material controle apresentaram-se íntegras, com aspecto fibrilar característico (fig. 2D). No material tratado foi notada desagregação dos polissacarídeos da superfície externa da parede. Esse comportamento pôde também ser observado nos tempos mais longos de cultura. As fibrilas que se desprenderam da estrutura da parede apresentaram-se mais elétron-densas do que o restante da parede celular (fig. 2E).

Os resultados obtidos nas dosagens de carboidratos encontram-se descritos na tabela 2. Os açúcares livres apareceram em maior quantidade, representando cerca de 11% no material controle e após 4 horas de incubação. Esses valores praticamente dobraram após 6 e 8 horas. A quantidade de polissacarídeos solúveis foi constante e próxima a 0,5% enquanto que o amido, representou 3% no material controle, aumentando significativamente para 6,5% no material tratado com 6 horas de incubação e decaindo novamente após esse tempo (Tabela 3).

Discussão

No presente trabalho, o material tratado com quitina foi menos corado pelo AT do que o controle, indicando que as células de cana responderam aos hidrolisados utilizados produzindo lignina, menos reativa ao corante, ou que ocorreram alterações nas pectinas presentes, tendo em vista o caráter catiônico do AT (Silva et al. 1997). Entretanto, como as células apresentaram reação positiva à floroglucina, pôde-se confirmar a hipótese da produção de material polifenólico.

Essa produção pôde ainda ser confirmada pelos resultados obtidos com as determinações das atividades de peroxidases e fenilalaninamonialase (PAL), que aumentaram em células tratadas nas mesmas condições (Gallão et al., submetido). A relação da produção de compostos fenólicos e aumento na atividade da PAL já foi anteriormente observada em células de cevada cultivadas em suspensão em presença de vários eliciadores, inclusive quitina (Peltonen et al 1997). Esses autores fizeram uma correlação entre o aumento da atividade dessa enzima e a produção de polifenóis detectados pela reação da floroglucina (Cahill & McComb 1992).

A floroglucina não é um corante mas produz uma substância colorida ao contato com lignina ou suberina em presença do ácido clorídrico. Os compostos da lignina colocados em evidência por essa reação foram identificados como aldeídos coniferílicos (Clifford 1974). A reação da floroglucina com hemiceluloses

também é possível tendo em vista que ela forma precipitados de diversas cores quando em presença de arabinose, glicose, manose, galactose e frutose em meio ácido (Lewis & Yamamoto 1990).

A reação de Feulgen é específica para DNA. Nesse método, é realizada uma hidrólise inicial com HCl que elimina proteínas e RNA, desnatura e remove bases púricas do DNA. Com isso, o grupamento aldeídico da desoxiribose é restabelecido e se liga ao Reativo de Schiff produzindo uma coloração magenta (Mello 1997). Devido a essa especificidade, o método foi utilizado para a medição dos diâmetros nucleares que revelaram um aumento significativo até 6 horas de incubação com a solução de quitina, demonstrando ter havido alterações no complexo DNP (DNA-proteínas) decorrentes da ação dos hidrolisados.

As micrografias eletrônicas confirmam esses resultados, através da morfologia dos núcleos do material controle que apresentaram cromatina bastante frouxa, sugerindo intensa atividade de transcrição. As células mais periféricas dos agregados celulares da suspensão sofreram ação mais intensa da solução. Com isso, muitos núcleos passaram a apresentar cromatina mais compactada e, em alguns casos, degeneração dos nucléolos, o que indica uma baixa atividade metabólica dessas células e até morte celular. Resultados semelhantes foram obtidos para embriões de alface e para sementes de feijão durante o envelhecimento (Villiers 1983, Begnami & Cortelazzo 1996). Foram ainda descritas alterações nucleares associadas à resposta de defesa de ervilha ao ataque de fungos sendo uma das conseqüências, a produção da fitoalexina pisatina (Hadwiger & Adams 1978).

A desagregação dos polissacarídeos das paredes das células de cana-de-açúcar em resposta ao hidrolisado de quitina foi semelhante ao já observado em células submetidas a oligossacarídeos biologicamente ativos (Hayashi et al 1990, Joseleau et al. 1994). Ela pode ser uma consequência do afrouxamento dos constituintes da parede, devido a ruptura de ligações covalentes entre as cadeias de polissacarídeos, pela ativação de enzimas hidrolíticas associadas à parede. Como decorrência dessa ação enzimática, ocorre a ruptura de polímeros não celulósicos (McDougall & Fry 1991), formando assim, uma rede fibrilar que vai progressivamente se desprendendo da parede celular. O fato do material ser mais reativo ao acetato de uranila, reforça este resultado sugerindo uma predominância de grupamentos ácidos que teriam maior afinidade pelo metal. Além disso, resultados de marcação com anticorpos para pectinas, revelam resposta positiva no material fibrilar desprendido da parede celular para Rubus fruticosus após tratamento com o nonassacarídeo XXFG (Ruel et al. 1995).

Apesar da quantidade de amido nas células de cana ser relativamente baixa, o hidrolisado de quitina estimulou a síntese desse polissacarídeo. Ao contrário do que foi observado em células de Citrus aurantium cultivadas em suspensão (dados não publicados) e células cotiledonares de feijão submetidas ao envelhecimento (Begnani & Cortelazzo 1996).

Dessa maneira podemos concluir que as células de cana-de-açúcar cultivadas em suspensão respondem ao hidrolisado de quitina produzindo lignina nas primeiras 6 horas de eliciação, mas possuem a capacidade de retornar a valores e condições normais de cultivo após 8 horas de tratamento.

Literatura citada

- Aldington S., McDougall G.J., Fry, S.C.: Structure-activity relationships of biologically active oligosaccharides. – *Plant Cell Environm.* **14**: 625-636, 1991.
- Begnami, C.N., Cortelazzo, A.L.: Cellular alterations during accelerated aging of French bean seeds. – *Seed Sci.Technol.* **24**: 295-303, 1996.
- Cahill, D.M., McComb, J.A.: A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of Eucalyptus calophylla (field resistant) and E. marginata (susceptible) when infected with Phytophthora cinnamomi. - *Physiol. mol. Plant Pathol.* **40**: 315-332, 1992.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M.: Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. – *Plant J.* **3**: 1-30, 1993.
- Clifford, M.N.: Specificity of acidic phloroglucinol reagents. – *J. Chromatogr.* **94**: 321-324, 1974.
- Cortelazzo, A.L.: Starch detection and dosage in Canavalia ensiformis and C. gladiata cotyledons, during the plantlet development. - *Rev. bras. Bot.* **15**: 157-162, 1992.
- Grima-Pettenati, J., Goffner, D.: Lignin genetic engineering revisited. – *Plant Sci.* **145**: 51-65, 1999.
- Hadwiger, L.A, Adams, M.J.: Nuclear changes associated with the host-parasite interaction between Fusarium solani and peas. – *Physiol. Plant Pathol.* **12**: 63-72, 1978.

- Hayashi T, Yoshida K, Ohsumi C: Regeneration of colchicine-induced single carrot cells. – Agric. Biol. Chem. **54**:1567-1568, 1990.
- Hawkins, S., Boudet, A.: Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (Eucalyptus gunni Hook): histochemistry of early changes in young plants. - Protoplasma **191**: 96-104, 1996.
- Joseleau, J.P., Chambat, G., Cortelazzo, A.L., Faik, A., Ruel, K.: Putative biological action of oligosaccharides on enzymes involved in cell-wall development. – Biochem. Soc. Trans. **22**: 404-409, 1994.
- Joseleau, J.P., Cortelazzo, A.L., Chambat, G., Ruel, K.: Activation of peroxidases from plant cell suspensions by xyloglucan oligosaccharide elicitors. – Plant Peroxidase Newsletter **8**: 8-13, 1996.
- Lewis, N.G., Yamamoto, E.: Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. - Annu. Rev. Plant Physiol. mol. biol. **41**: 445-76, 1990.
- McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V., Owens, H.S.: Determination of starch and amylose in vegetables. - Anal. Chem. **22**: 1156-1158, 1950.
- McDougall, G.J., Fry, S.C.: Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. - Plant Physiol **93**: 1042-1048, 1990.
- McDougall, G.J., Fry, S.C.: Xyloglucan nonasaccharide, a naturally occurring oligosaccharin, arises in vitro by polysaccharide breakdown. – J. Plant Physiol. **137**: 332-336, 1991.
- McGhie, T.K., Masel, N.P., Maclean, D., Croft, B.J., Smith, G.R.: Biochemical responses of suspension-cultured sugarcane cells to an elicitor derived from the

- root pathogen Pachymetra chaunorhiza. – Aust. J. Plant. Physiol. **24**: 143-149, 1997.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C.: A reação de Feulgen. – Cienc. Cult. **30**: 665-676, 1978.
- Mello, M.L.S.: Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. – Brazil. J. Genet. **20**: 257-264, 1997.
- Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497, 1962.
- Peltonen, S., Mannonen, L., Karjalainen, R.: Elicitor-induced changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in barley cell suspension cultures. – *Plant Cell Tis. & Org. Cult.* **50**: 185-193, 1997.
- Ruel, K., Cortelazzo, A.L., Chambat, G., Faïk, A.: Marais M.F., Joseleau, J.P. Rapid wall surface rearrangements induced by oligosaccharides in suspension-cultured cells. *Current Issues in Plant mol. and cel. biol.* 445-455, 1995.
- Silva, T.R.G., Cortelazzo, A.L. & Dietrich, S.M.C.: Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. – *Ciênc. Cult.*, **49**: 219-222, 1997
- Spurr, A.R.: A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. – *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-43, 1969.
- Vallet, C., Chabbert, B., Czaninski, Y., Monties, B.: Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. – *Ann. Bot.* **78**: 625-632, 1996.
- Vance, C.P., Kirk, T.K., Sherwood, R.T.: Lignification as a mechanism of disease resistance. – *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**: 259-288, 1980.

- Vidal, B.C.: Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. - Cell. mol. Biol. **22**: 45-64, 1977.
- Villegas, M, Brodelius, P.E.: Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures. *Physiol Plant* **78**: 414-420, 1990.
- Villiers, T.A.: Ultrastructural changes in seed dormancy and senescence. In *CRC Series in Aging: Senescence in plants* (Thimann, K.V. ed), CRC Press, Boca Raton. p.38-66, 1983.

Legendas

Figura 1. Cortes de células de Saccharum officinarum cultivadas em suspensão. **A e B:** Reação do PAS. As paredes apresentam-se intensamente coradas. **A)** material controle; **B)** material tratado com 6h de incubação. **C e D:** Reação com floroglucina **C)** material controle; **D)** Material tratado com 6h de incubação. Nota-se uma resposta positiva ao método nas paredes celulares. **E e F:** Reação de Feulgen. Núcleos são intensamente corados. **E)** material controle; **F)** material tratado com 6h de incubação. Barras: A e B: 14 μm ; C, D, E, e F: 47 μm

Figura 2. Micrografias eletrônicas de células de Saccharum officinarum cultivadas em suspensão, com visualização dos núcleos, regiões de cromatina condensada (*) nucléolo (★). **A)** material controle. **B e C)** material após 8 horas de incubação com o hidrolisado de quitina **D)** material controle mostrando parede celular íntegra e com aspecto fibrilar característico. **E)** material tratado com 6 horas de incubação. Nota-se uma desagregação dos polissacarídeos na forma de fibrilas mais elétrondensas na superfície das paredes celulares (➔). Barras: A, B e E: 1 μm ; C: 0,2 μm D: 0,6 μm .

Tabela 1. Métodos de coloração utilizados e estruturas coradas nas células de Saccharum officinarum.

Estrutura	Controle	Trat. (4h)	Trat. (6h)	Trat. (8h)
Paredes celulares				
Açúcares neutros	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++
Açúcares ácidos	AT: ++	AT: ++	AT: +	AT: ++
Metacromasia	AT: ++	AT: ++	AT: +	AT: ++
Citoplasma				
Corpos proteícos	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++	PAS: +++
	AT: -	AT: -	AT: -	AT: -
Reação com Floroglucina	-	+	++	+

AT: Azul de Toluidina em pH 4,0; PAS: método do PAS (ácido periódico, reativo de Schiff). - não corado; + pouco corado; ++ corado; +++ intensamente corado.

Tabela 2. Medidas das áreas nucleares (μm) das células de S. officinarum

Horas	Controle	Quitina
4	9 ± 1 a,B*	11 ± 3 a,A
6	6 ± 1 b,B	11 ± 2 a,A
8	9 ± 2 a,A	9 ± 2 b,A

*Letras minúsculas e iguais em uma mesma coluna indicam resultados sem diferença significativa a $P < 0,05$.
 Letras maiúsculas e iguais em uma mesma linha indicam resultados sem diferença significativa a $P < 0,05$.

Tabela 3. Dosagens de carboidratos (mg/g) nas células liofilizadas de Saccharum officinarum

Tratamento	Açúcares livres	Açúcares solúveis	Amido
Controle	117 ± 48a*	5,1 ± 0,2b	29 ± 0,3a
4 horas	110 ± 88a	4,3 ± 1,8a,b	35 ± 3a
6 horas	215 ± 9b	2,3 ± 0,4a	63 ± 7b
8 horas	192 ± 20a,b	3,2 ± 1,3a,b	51 ± 5c

*Letras iguais em uma mesma coluna indicam resultados sem diferença significativa a $P < 0,05$.

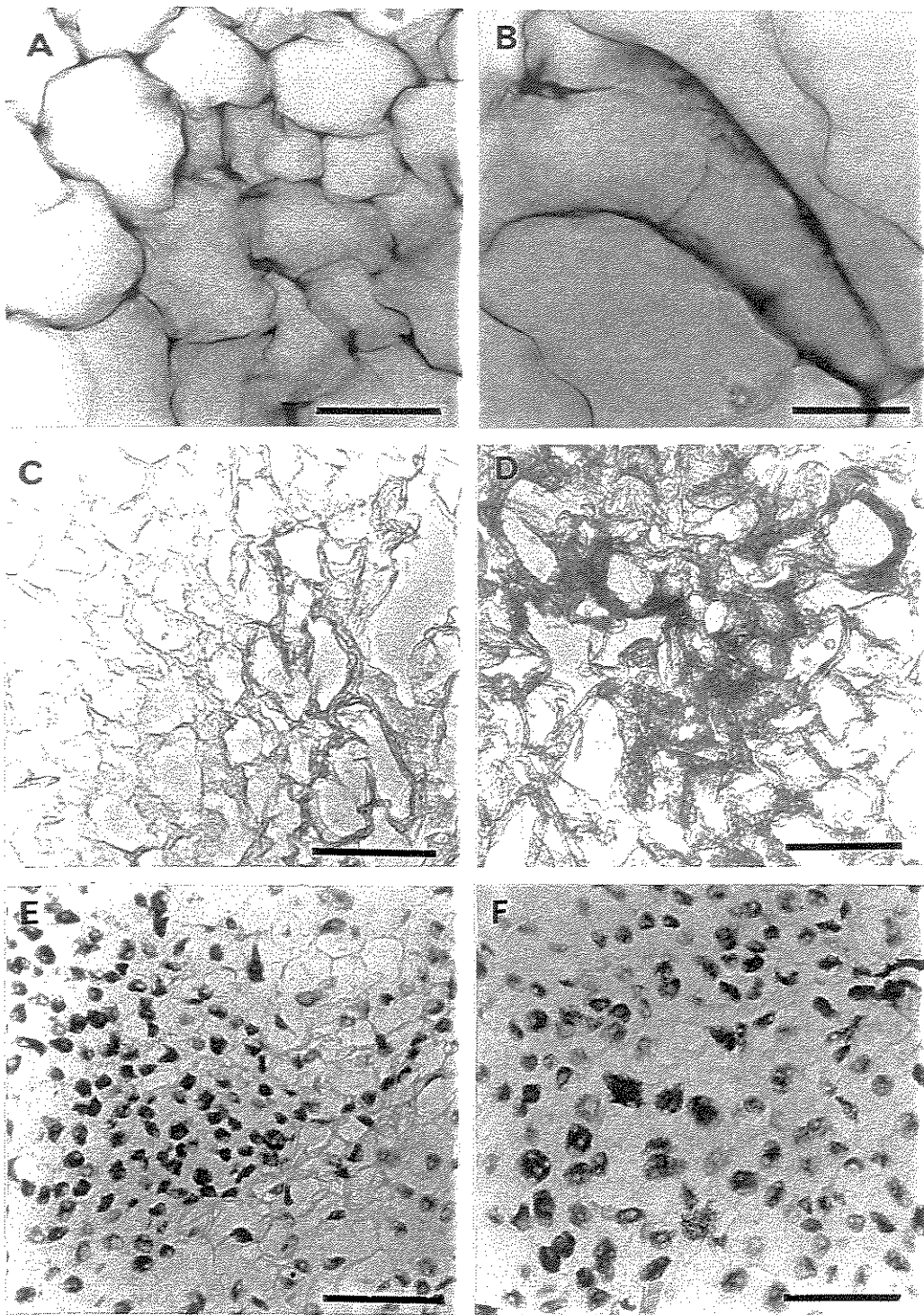


Figura 1

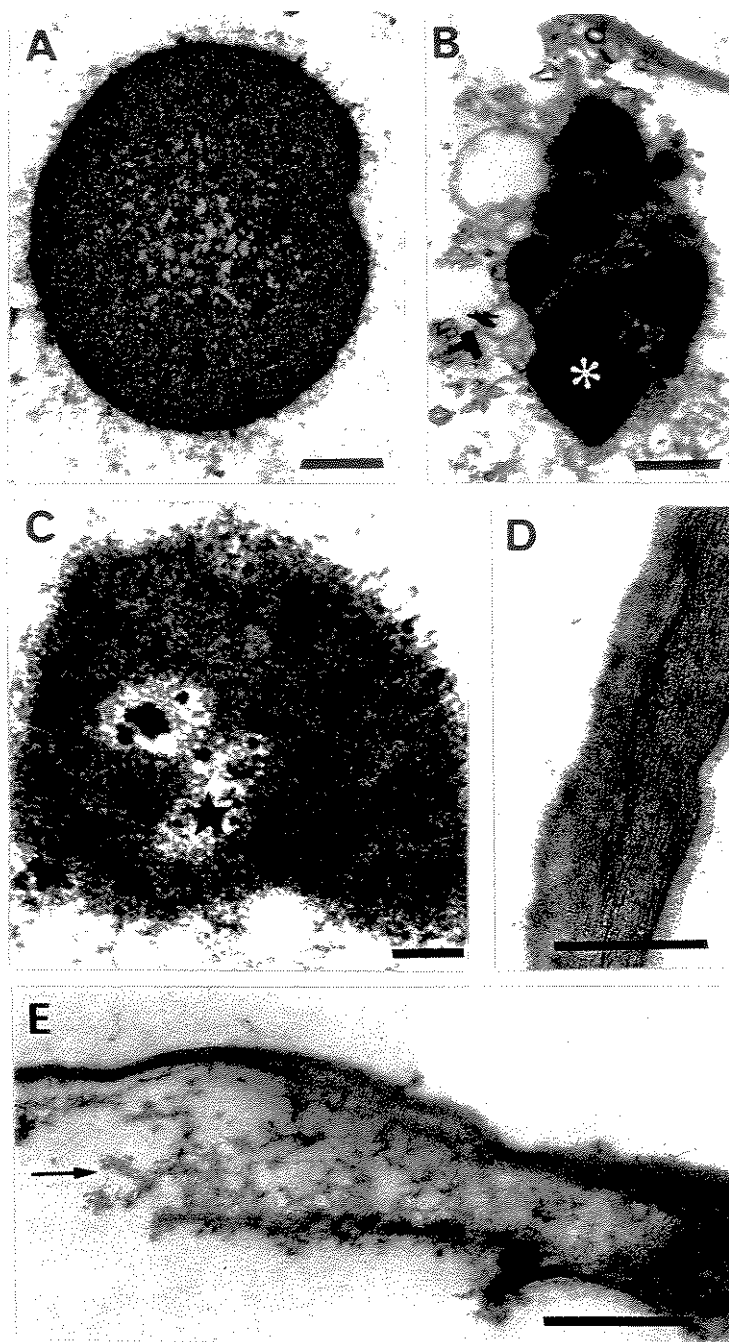


Figura 2

8. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os hidrolisados de quitina são capazes de induzir respostas de defesa tanto na cana-de-açúcar quanto na laranja, sendo estas mais rápidas na segunda espécie (2h) do que na primeira (6h). Além disso, as células demonstraram capacidade de retornar ao seu metabolismo normal.

O hidrolisado de quitina induz aumento na atividade peroxidásica, predominando na laranja as isoformas básicas e na cana, as ácidas. Devido a reação positiva para a floroglucina pode-se sugerir que essas peroxidases estejam envolvidas no processo de lignificação. Além disso, ocorre aumento na atividade da fenilalaninamonialiasa durante o processo.

As alterações morfológicas obtidas foram semelhantes às aquelas observadas durante o envelhecimento celular em outras espécies, demonstrando assim a capacidade do hidrolisado em acelerar o processo de envelhecimento e morte celulares tanto na mono quanto na dicotiledônea utilizadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barber, M.S., Bertram, R.E., Ride, J.P.: Chitin oligosaccharides elicit signification in wounded wheat leaves. – *Physiol. mol. Plant Pathol.* **34**: 3-12, 1989.
- Baron-Epel, O., Gharyl, P.K., Schindler, M.: Pectins as mediators of wall parasitism in soybean cells. - *Planta* **175**: 389-395, 1988.
- Bartnicki-Garcia, S.: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. - *Annu. Rev. Microbiol.* **22**: 87-108, 1968.
- Boudet, A.M., Grima-Pettenati, J.: Lignin genetic engineering. - *Mol. Breeding* **2**: 25-39, 1996
- Brett, C., Waldron, K.: Physiology and biochemistry of plant cell walls. London Unwin Hyman, 193p, 1990.
- Bruce, R.J., West, C.A: Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension-cultures of castor bean. – *Plant Physiol.* **91**: 889-897, 1989.
- Buckeridge, M.S., Dietrich, S.M.C.: Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). - *Plant Sci.* **117**: 33-43, 1996.
- Buckeridge, M.S., Crombie, H.J., Mendes, C.J.M., Reid, J.S.G., Gidley, M.J., Vieira, C.J.: A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. - *Carbohydr. Res.*, 928-934, 1997.

- Burlat, V., Ambert, K., Ruel, K., Joseleau, J.P.: Relationship between the nature of lignin and the morphology of degradation performed by white-rot fungi. - *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 645-654, 1997.
- Camm, E.L., Towers, G.H.N.: Phenylalanine ammonia-lyase. - *Phytochem.* **12**: 961-973, 1973.
- Campbell, M.M, Ellis, B.: Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. I. Induction of phenylpropanoid metabolism. - *Planta*, **186**: 409-417, 1992
- Campbell, M.M., Sederoff, R.: Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvements of plants. - *Plant Physiol.* **110**: 3-13, 1996.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M.: Structural models of primary Cell Wall in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. - *Plant J.*, **3**: 1-30, 1993.
- Carpita, N.C.: Structure and biogenesis of the cell walls of grasses - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **47**: 445-76, 1996.
- Cassab, G.I., Varner, J.E.: Cell Wall proteins. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **39**: 321-342, 1988.
- Chambat, G., Cartier, N., Lefévre, A., Marais, M.F. Joseleau, J.P.: Changes in cell wall and extracellular polysaccharides during the culture cycle of *Rubus fruticosus* cells in suspension culture. - *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 655-664, 1997.
- Cortelazzo, A.L., Marais, M.F. Joseleau, J.P.: Changes in peroxidases in the suspension culture of *Rubus fruticosus* during growth. - *Plant Cell Tis. &*

- Organ Cult. **46**: 27-33, 1996.
- Cosgrove, D.J.: Cell wall loosening by expansins. - Plant Physiol. **118**: 333-339, 1998.
- Delmer, D.P., Amor, Y.: Cellulose biosynthesis. - Plant Cell **7**: 987, 1995.
- Dixon, R.A.: The phytoalexin responses: elicitation, signalling and control of host gene expression. - Biol. Rev. **61**: 239-291, 1986.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J.: Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens. - Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. biol. **41**: 339-367, 1990.
- Ebel, J.: Phytoalexin synthesis, the biochemical analysis of the induction process. - Annu. Rev. Phytopathol. **24**: 235-264, 1986
- Ebel, J., Cosio, E.G.: Elicitors of plant defense responses. Internat. - Rev. Cytol. **148**: 1-36, 1994.
- Fanutti, C., Gidley, M.J., Reid, J.S.G.: Substrate subsite recognition of the xyloglucan *endo*-transglycosylase or xyloglucan-specific *endo*-(1 → 4)- β -D-glucanase from the cotyledons of germinated nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seeds. - Planta **200**: 221-228, 1996.
- Fry, S.C.: Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of Angiosperms. - Annu. Rev. Plant Physiol. **37**: 165-86, 1986.
- Fry, S.C.: The structure and functions of Xyloglucan - J. Exptl. Bot. **40**: 1-11, 1989.
- Fry, S.C.: Loosening the ties. A new enzyme, which cuts and then re-forms glycosidic bonds in the cell wall, may hold the key to plant cell growth. -

Current Biol. **3**: 355-357, 1993.

Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F.J., Greppin, H.: A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. - *Physiol. Plant* **64**: 418-423, 1985.

Gotthard, U., Grambow, H.J.: Near-isogenic wheat suspension cultures: establishment, elicitor induced peroxidase activity and potential use in the study of host/pathogen interactions. - *J. Plant Physiol.* **139**: 659-665, 1992.

Gupta, S., Acton, G.J.: Purification to homogeneity and some properties of L-phenylalanine ammonia-lyase of irradiated mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. - *Biochem. biophys. Acta* **570**: 187-197, 1979.

Hahlbrock, K., Scheel, D.: Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **40**: 347-369, 1989

Havir, E.A., Hansonm, K.R.: L-phenylalanine ammonia-lyase. 1. Purification and molecular size of the enzyme from potato tubers. - *Biochem.* **7**: 1896-1903, 1968.

Havir, E.A., Reid, P.D., Marsh, H.V.Jr.: L-Phenylalanine ammonia-lyase (Maize). Evidence for a common catalytic site for L-phenylalanine ammonia-lyase and L-tyrosine. - *Plant Physiol.* **48**: 130-136, 1971.

Havir, E.A.: Phenylalanine ammonia-lyase: Purification and characterization from soybean cell suspension cultures. - *Arch. Biochem. biophys.* **211**: 556-563, 1981.

Hayashi, T.: Xyloglucan in the primary cell wall. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* **40**: 139-168, 1989.

- Higuchi, T.: Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. - Wood Sci. Technol. **24**: 23-63, 1990.
- Jones, D.H.: Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. - Phytochem. **23**: 1349-1359, 1984.
- Joseleau, J.P., Chambat, G.: Structure of the primary Cell Wall of suspension-cultured *Rosa glauca* cells. II. Multiple forms of Xyloglucan. - Plant Physiol. **74**: 694, 1984.
- Joseleau, J.P., Cortelazzo, A.L., Chambat, G., Ruel, K.: Activation of peroxidases isoenzyme of high pI from suspension by xyloglucan oligosaccharide elicitors. - Plant Peroxidase Newsletter **8**: 8-13, 1996.
- Joseleau, J.P., Ruel, K.: Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes. An investigation by fourier transform infrared cross-polarization-magic angle spinning ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy and immunocytochemical Transmission Electron Microscopy. - Plant Physiol. **114**: 1123-1133, 1997.
- Kim, J.B., Carpita, N.C.: Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharids during elongation of maize coleoptiles. - Plant Physiol. **98**: 646-653, 1992.
- Koukol, J., Conn, E.E.: The metabolism of aromatic compounds in higher plants: IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. - J. Biol. Chem. **236**: 2692-2698, 1961.
- Lesney, M.S.: Growth responses and lignin production in cell suspension of *Pinus elliotii* "elicited" by chitin, chitosan or mycelium of *Cronartium quercum* f.sp.

- fusiforme. - Plant Cell Tis. & Organ Cult. **19**: 23-31, 1989.
- Lesney, M.S.: Effect of "elicitors" on extracellular peroxidase activity in suspension-cultured slash pine (*Pine elliottii* Engelm.). - Plant Cell Tis. & Organ Cult. **20**: 173-175, 1990.
- Lewis, N., Yamamoto, E.: Lignin, occurrence biogenesis and biodegradation. - Annu Rev. Plant. Physiol. mol. Biol., **41**: 455-496, 1990.
- McCann , M.C., Roberts, K.: Changes in cell wall architecture during cell elongation. - J. Exptl. Bot. **45**: 1683-1691, 1994.
- McDougall, G.J., Fry, S.C.: Xyloglucan Oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. - Plant Physiol. **93**: 1042-1048, 1990.
- McDougall, G.J: Cell-wall-associated peroxidases and lignification during growth of Flax fibres. - J. Plant Physiol. **139**: 182-186, 1991.
- McQueen-Mason, S.J., Cosgrove, D.J.: Expansin mode of action on cell walls. - Plant Physiol. **107**: 87-100, 1995.
- Melo, N.S., Cabral, J.M.S., Fevereiro, M.P.: Extracellular peroxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. Purification and characterization of two cationic enzymes. - Plant Sci. **106**: 177-184, 1995.
- Melo, N.S., Larsen E., Wellinder K.G., Fevereiro, M.P.: Characterization of two major cationic peroxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. - Plant Sci. **122**: 1-10, 1997.
- Molano, J., Polacheck, I., Duran, A., Cabib, E.: Na endochitinase from wheat germ. - J. Biolog. Chemist. **254**: 4901-4907, 1979.

- Morales, M., Ros Barceló, A. A basic peroxidase isoenzymes from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. – *Phytochem.* **45**: 229-232, 1997.
- Müsel, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquet, G., Lapierre, C., Speth, V., Schopfer, P.: Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. - *Planta* **201**: 146-159, 1997.
- Negrel, J., Javelle, F.: Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase-or pronase-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). - *Physiol. Plant.* **95**: 569-574, 1995.
- Nichols, E.J., Beckman, J.M., Hadwiger, L.A.: Glicosidic enzyme activity in pea-*Fusarium solani* interactions. - *Plant Physiol.* **66**: 199-204, 1980.
- Nishitani, K.: Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. - *J. Plant Res.* **108**: 137-148, 1995.
- Parvez, M.M., Wakabayashi, K., Hoson, T., Kamisaka, S.: White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. - *Physiol. Plant.* **99**: 39-48, 1997.
- Pearce, R.B., Ride, J.P.: Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. – *Physiol. Plant Pathol.* **20**: 119-123, 1982.
- Peltonen, S., Mannonen, L., Karjalainen, R.: Elicitor-induced changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in barley cell suspension cultures. - *Plant Cell Tis. & Organ Cult.* **50**: 185-193, 1997.
- Ryan, C.A.: Oligosaccharides as recognition signals for the expression of

defensive genes in plants. - *Biochemistry*, **27**: 8879-8883, 1988.

Talbot, L.D., Ray, P.M.: Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. - *Plant Physiol.* **98**: 369-379, 1992.

Tanaka, Y., Uritani, I.: Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase in cut-injured sweet potato. - *J. Biochem.* **81**: 963-970, 1977.

Tanaka, Y., Matsuoka, M., Yamamoto, N., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y., Ozeki, Y.: Structure and characterization of cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. - *Plant Physiol.* **90**: 1403-1407, 1989.

Vance, C.P., Kirk, T.K., Sherwood, R.T.: Lignification as a mechanism of disease resistance. - *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**: 259-288, 1980.

Whetten, R., Sederoff, R.: Lignin biosynthesis. - *Plant Cell* **7**: 1001-1013, 1995.

Whitmore, F.W.: Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. - *Phytochem.* **17**: 421-425, 1978.

York, W.S., Darvill, A.G., Albersheim, P.: Inhibition of 2,4-D acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. - *Plant Physiol.* **75**: 295-297, 1984.