

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE LECTINAS AGLUTINANTES DE FEIJÃO
(Phaseolus vulgaris, L.) E CÉLULAS DE Rhizobium phaseoli

RITA DE CÁSSIA VITTI BRUSANTIN

Orientador; ERIC DERBYSHIRE

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1989

B912e Brusantin, Rita de Cássia Vitti
Estudo da interação entre lectinas aglutinantes de feijão (Phaseolus vulgaris, L.) e células de Rhizobium phaseoli. Piracicaba, 1989.
98p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio 2. Feijão - Bioquímica 3. Lectina de feijão 4. Nitrogênio - Fixação 5. Relação bactéria-lectina I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE LECTINAS AGLUTINANTES DE FEI-
JÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E CÉLULAS DE *Rhizobium phaseoli*

Rita de Cássia Vitti Brusantin


Aprovada em 14/04/89

Comissão Julgadora:

Eric Derbyshire

Paulo R. de Camargo e Castro

Neuza de Lima Nogueira


ERIC DERBYSHIRE

Aos meus pais *Lino* e *Dorayrthes*
e a meus irmãos

DEDICO

Ao *Marcelo* e ao *Leonardo*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- . Ao Dr. Eric Derbyshire pela orientação do trabalho realizado;
- . À Dra. Maria Teresa V. Carvalho por sugestões e discussões úteis;
- . Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) onde foi realizado o trabalho;
- . Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudos concedidas;
- . Às Seções de Ciências Animais, Microbiologia do Solo, Microscopia Eletrônica, Química do Solo e Radioisótopos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) pelo empréstimo de equipamentos, fornecimento de materiais e demais auxílios prestados;
- . A todos os amigos da Seção de Biologia das Proteínas Vegetais e demais amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	
SUMMARY.....	
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO.....	04
2.1. Considerações Gerais sobre o <i>Rhizobium</i>	04
2.2. Incidência de Nodulação.....	06
2.3. Aspectos Gerais da Ligação Simbiótica.....	06
2.4. Lectinas.....	07
2.4.1. Introdução.....	07
2.4.2. Histórico.....	08
2.4.3. Localização na planta.....	13
2.4.4. Papel biológico.....	14
2.4.5. Lectinas; a base da especificidade....	20
2.4.6. Fatores que influenciam a ligação <i>Rhizobium</i> -lectina.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Materiais.....	28
3.2. Métodos.....	29
3.2.1. Curvas de crescimento de <i>R. phaseoli</i> , estirpes CIAT 1899 e C-05.....	29

	Página
3.2.1.1. Método colorimétrico.....	29
3.2.1.2. Método do plaqueamento.....	30
3.2.2. Proteínas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	33
3.2.2.1. Proteínas totais.....	33
3.2.2.2. Fracionamento.....	33
3.2.3. Atividades aglutinantes das lectinas..	36
3.2.3.1. Contra eritrócitos.....	36
3.2.3.2. Contra bactérias.....	36
3.2.4. Comparação de dois métodos para ava-	
liação direta da aglutinação <i>Rhizobium-</i>	
<i>-lectina</i> ,.....	37
3.2.4.1. Aglutinação direta em placas	
de microdiluição.....	38
3.2.4.2. Aglutinação direta em lâminas	
de microscópio.....	39
3.2.5. Fatores que podem regular a aglutina-	
ção <i>Rhizobium-lectina</i>	39
3.2.5.1. Determinação da relação entre	
a concentração de lectina e o	
número de células bacterianas	39
3.2.5.2. Determinação da época de de-	
seenvolvimento de receptores	
lectinícos em <i>R. phaseoli</i>	40

3.2.5.3. Interferência do pH na ligação <i>Rhizobium</i> -lectina.....	42
3.2.6. Determinação da aglutinação através de lectina radiomarcada.....	43
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Desenvolvimento das culturas de <i>Rhizobium phaseoli</i> estirpes C-05 e CIAT 1899.....	46
4.2. Caracterização dos extratos de três cultivares de feijoeiro, <i>Phaseolus vulgaris</i> , L.....	48
4.3. Purificação das lectinas de <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivares Goiano Precoce, Carioca e Negro Argel.....	48
4.4. Detecção da ligação lectina- <i>Rhizobium</i> através de testes de aglutinação.....	56
4.5. Condições que podem afetar a aglutinação.....	58
4.6. Utilização de lectinas marcadas.....	61
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	77
7. LITERATURA CITADA.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Concentração e quantidade de lectina radiomarcada com ^{14}C , salina e cultura bacteriana, utilizadas para incubação.....	45
2	Eritroaglutinação de extratos brutos de três cultivares de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	50
3	Aglutinação do material cromatográfico de 3 cultivares de feijoeiro contra sangue humano.....	54
4	Eritroaglutinação dos EBs e lectinas purificadas de 3 cultivares de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	56
5	Eritroaglutinação de <i>R. phaseoli</i> incubado com o extrato protéico de feijoeiro (<i>P. vulgaris</i> L.).....	58

TABELA

Página

6	Aglutinação de <i>R. phaseoli</i> , CIAT 1899 pelo método direto de aglutinação em lâminas para microscópio.....	60
7	Aglutinação de <i>R. phaseoli</i> , CIAT 1899 em diferentes fases de desenvolvimento.....	61
8	Aglutinação de diferentes concentrações de <i>R. phaseoli</i> , CIAT 1899 por diferentes concentrações de lectina comercial ou extrato protéico de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	63
9	Aglutinação de eritrócitos humanos pelos sobrenadantes das incubações <i>R. phaseoli</i> , CIAT 1899 - lectina de <i>P. vulgaris</i> cultivar Negro Argel em diferentes pHs.....	64

TABELA

Página

10	Aglutinação de eritrócitos humanos pelos precipitados das incubações de <i>R. phaseoli</i> , CIAT 1899 com lectina de feijoeiro cultivar Negro Argel, em diferentes pHs.....	65
11	Aglutinação dos precipitados das incubações de <i>R. phaseoli</i> , CIAT 1899 com lectina de feijoeiro cultivar Negro Argel a nível microscópico.....	66
12	Eritroaglutinação do extrato protéico e lectina purificada de feijoeiro, cultivar Carioca radiomarcados com ^{14}C	68
13	Observação microscópica da aglutinação de <i>R. phaseoli</i> estirpe CIAT 1899 com lectina de feijoeiro cultivar Carioca radiomarcada com ^{14}C	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Curva padrão para determinação de proteína solúvel pelo método de Lowry (LOWRY et alii, 1951).....	41
2	Curvas de crescimento de <i>R. phaseoli</i> estirpes C-05 e CIAT 1899 realizadas pelo método do plaqueamento.....	47
3	Curva de crescimento de <i>R. phaseoli</i> estirpe CIAT 1899 realizada pelo método colorimétrico.....	48
4	Perfis protéicos dos extratos de três cultivares de <i>P. vulgaris</i> e uma lectina comercial (PHA) obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições ácidas.....	51

- 5 Perfil de eluição obtido por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-tiroglobulina de um extrato protéico de feijoeiro(*P. vulgaris*) cultivar Negro Argel... 53
- 6 Perfis protéicos das lectinas purificadas em cromatografia de afinidade de três cultivares de *P. vulgaris* e de uma lectina comercial (PHA) obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições ácidas..... 55

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE LECTINAS AGLUTINANTES DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris*, L.) E CÉLULAS DE *Rhizobium phaseoli*

Autora: RITA DE CÁSSIA VITTI BRUSANTIN

Orientador: Prof. Dr. ERIC DERBYSHIRE

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram verificar a ligação da lectina de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) às células de *Rhizobium phaseoli*, examinar alguns fatores que podem regular esta ligação e avaliar a especificidade da ligação *Rhizobium phaseoli*-lectina de feijoeiro.

Aspectos gerais da ligação simbiótica *Rhizobium*-leguminosa foram descritos brevemente. Numa revisão mais detalhada foi dada ênfase a ligações específicas em sistemas simbióticos *Rhizobium*-leguminosa como por exemplo *R. japonicum*-soja, *R. trifolii*-trevo, *R. meliloti*-alfafa, *R. leguminosarum*-ervilha e mais especificamente no sistema *R. phaseoli*-feijão.

Proteínas extraídas da farinha cotiledonar de feijão, com água destilada e a concentração de proteínas solúveis foi determinada por um método colorimétrico. Lectinas foram isoladas do extrato a-

través de fracionamento por cromatografia de afinidade. Estas composições protéica e lectínica foram analisadas por sistemas eletroforéticos em géis de poliacrilamida. As atividades eritroaglutinantes específicas dos extratos, bem como das lectinas isoladas foram determinadas contra eritrócitos humano e de vaca.

Estirpes de *R. phaseoli* foram crescidas a 28°C em meio líquido levedura-manitol e o número de células durante o desenvolvimento da cultura foi determinado colorimetricamente após tratamento das células com cloreto de trifinilte-trazólio e pelo método de plaqueamento.

A atividade aglutinante dos extratos de sementes e lectinas foi determinada contra suspensões dessas bactérias. A especificidade também foi avaliada através de aglutinação indireta. Vários ensaios foram feitos para avaliar os fatores que podem regular a ligação *R. phaseoli*-lectina de feijoeiro. Experimentos preliminares usando lectinas marcadas com ¹⁴C foram iniciados com a finalidade de obter um procedimento com maior grau de sensibilidade.

O extrato, bem como a lectina isolada das sementes de todos os cultivares estudados aglutinaram eritrócitos humano e de vaca, porém a atividade específica de cada uma das amostras foi diferente. O nível de aglutinação bacteriana também diferiu entre os cultivares. Quando diferentes estirpes de *R. phaseoli* foram utilizadas com o mesmo cultivar de feijoeiro

o nível de aglutinação também foi diferente. As lectinas extraídas dos diferentes cultivares de feijoeiro migraram durante a eletroforese com mobilidades semelhantes às aquelas isolectinas da lectina comercial, fitohemaglutina (PHA).

Células de *R. phaseoli* foram aglutinadas por extratos heterógenos, PHA e lectinas isoladas no laboratório, porém esta aglutinação foi dependente da relação entre a concentração de proteínas e das células bacterianas, bem como da idade da cultura. O pH da incubação também influenciou na ligação *Rhizobium*-lectina.

Indicações indiretas de afinidade preferencial entre *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 e *P. vulgaris* cultivar Negro Argel e entre a estirpe C-05 e os cultivares Goiano Precoce e Carioca foram observadas.

Os dados acima resumidos, discutidos em relação a resultados de outros pesquisadores, levaram à conclusão de que extratos protéicos contendo lectina podem aglutinar células de *R. phaseoli*; a detecção desta aglutinação foi fortemente dependente da fase de desenvolvimento da cultura e da relação entre a concentração de lectina e o número de células bacterianas. Houve indicações de que a ligação *R. phaseoli* à lectina de *P. vulgaris* exibe um certo grau de afinidade preferencial entre os cultivares e estirpes estudadas sendo estas diferenças quantitativas e não qualitativas.

**STUDIES OF THE INTERACTION BETWEEN AGGLUTINATING LECTINS
OF BEANS (*Phaseolus vulgaris*, L.) AND *Rhizobium phaseoli* CELLS**

Author: RITA DE CÁSSIA VITTI BRUSANTIN

Adviser: Prof. Dr. ERIC DERBYSHIRE

SUMMARY

The objectives of the present study were to verify the binding of the bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) lectin to *Rhizobium phaseoli* cells, to examine some factors that can regulate this binding and to evaluate the specificity in the binding.

General aspects of the symbiotic binding of *Rhizobium* to legumes were described briefly. In a more detailed review was given emphasis to specificity in the symbiotic systems *Rhizobium*-legume as for example *R. japonicum*-soybean, *R. trifolii*-clover, *R. meliloti*-alfafa, *R. leguminosarum*-pea and more specifically in the *R. phaseoli*-bean system.

The protein was extracted from a seed meal with distilled water, and the concentration of the soluble protein was determined by a colorimetric method. The isolation of the lectins were made through division into fractions by affinity

chromatography. The protein and lectin compositions were analysed by electrophoretic systems in polyacrilamide gels and their specific erythroagglutinating activity was determined against human and cow erythrocytes.

Strains of *R. phaseoli* were harvested at 28°C in yeast extract-mannitol medium. The number of cells during the development of the culture was determined colorimetrically after treatment of the cells with triphenyl tetrazolium chloride and by a plating method.

The agglutinating activities of the extracts of seeds and lectins were determined against suspensions of the bacteria. Specificity also was evaluated through indirect agglutination tests. To evaluate the factors that can regulate the binding *R. phaseoli*-bean lectin various assays were made. Preliminary experiments using ¹⁴C lectin labelled were started with the purpose of obtaining a procedure with a higher degree of sensibility.

The extracts as well as the purified lectin agglutinated human and cow erythrocytes, however the specific activities of the samples were different. The bacterial agglutination levels were different among the cultivars. When different strains of *Rhizobium* were used with the same cultivar of bean, the agglutination levels also were different. The lectins extracted from the different cultivars of beans migrated during

electrophoresis with mobilities similar to the isolectins of the commercial lectin, phytohemagglutinin (PHA).

R. phaseoli cells were agglutinated by the heterogeneous extracts and the isolated lectins. This agglutination was dependent on the relation between the protein and the bacteria cell concentration. The agglutination also was dependent on the culture age. The incubation pH also influenced in the *Rhizobium*-lectin binding.

Indirect indication of preferential affinity between *R. phaseoli* strain CIAT 1899 and *P. vulgaris* cultivar Negro Argel and between the strain C-05 and the cultivars Goia no precoce and Carioca were verified.

The datas summarized above were discussed in relation to results of the others workers. We conclude that protein extracts containing lectin can agglutinate *R. phaseoli* cells and that the detection of this agglutination was strongly dependent on the stage of the development of the culture and/or the relation between the lectin concentration and the number of the bacteria cells. There are indications that the *R. phaseoli*-*P. vulgaris* lectin binding shows a certain degree of specificity,

1. INTRODUÇÃO

A importância do nitrogênio na produção de alimentos é atualmente bastante conhecida. Entretanto, o suprimento deste elemento na forma de fertilizantes é ainda precário devido ao seu elevado custo, e a uma utilização ineficiente, especialmente na agricultura tropical.

A forma mais barata de nitrogênio prontamente disponível é o N_2 , cuja principal fonte é a atmosfera. A maneira pela qual as plantas utilizam-se desta, é a fixação do mesmo pelas leguminosas. Este modo de aquisição de nitrogênio pode também beneficiar espécies consorciadas e outras cultivares ou pastagens vindouras via resíduos de plantas ricas em nitrogênio.

As pesquisas agrícolas visam dois objetivos principais. O primeiro deles é aumentar a produção de alimentos por unidade de área e o outro, é manter esta produção a um custo reduzido. Por outro lado, as pesquisas na área de fixação de nitrogênio objetivam além do aumento de produtividade, redução da dependência de fertilizantes nitrogenados e do declínio de N_2 de muitos de nossos solos cultiváveis.

A produção média de dois milhões de toneladas, faz do Brasil um dos maiores produtores de feijão do mundo. A-

lém disso, para grande parte da população brasileira, o feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) é uma das principais fontes de alimento. Como outras leguminosas, o feijão apresenta altos teores de proteínas, além de fixar o nitrogênio atmosférico, com o auxílio do *Rhizobium phaseoli*, a bactéria simbiote do feijão.

Ocorrem diferenças nos valores nutritivos das proteínas do feijão e algumas são consideradas tóxicas como a fração protéica denominada lectina. Desde a sua descoberta há exatamente um século, muito tem sido estudado sobre as lectinas e é sabido que elas possuem capacidade de interagir e aglutinar eritrócitos de animais, estimular a divisão de linfócitos e aglutinar células humanas malignas; porém poucas conclusões foram tiradas a respeito da função endôgena das lectinas. Verificou-se que elas podem exercer um papel de proteção das plantas contra patógenos e predadores e que podem ligar-se às bactérias fixadoras de nitrogênio. Esta última consideração mostra que possivelmente as lectinas estejam envolvidas na ligação do *Rhizobium* às raízes de leguminosas.

A primeira etapa da ligação simbiótica leguminosa-bactéria é a ligação do simbiote às raízes do hospedeiro, e o sucesso desta ligação é caracterizado por um alto grau de seletividade hospedeiro-simbiote.

Os objetivos do presente estudo foram verificar a ligação da lectina do feijão às células do simbiote *Rhizobium phaseoli*, examinar alguns fatores que podem regular esta

ligação, incluindo época de desenvolvimento da cultura, concentração de células bacterianas e lectina, influência do pH e ainda avaliar a especificidade da ligação *R. phaseoli*-lectina de *P. vulgaris*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O *Rhizobium*

Desde que deformações nas raízes de certas plantas foram observadas, determinou-se que eram causadas pela penetração de uma bactéria do solo no pelo radicular de uma planta. A partir de então a plasmalema das células radiculares começa a envolver a bactéria, como um tubo, fazendo-a penetrar nas células do córtex inter ou intra celularmente. Assim, as células corticais adjacentes são estimuladas para divisão e crescimento, formando um nódulo na raiz (SCOTT, 1978). Nos nódulos, a bactéria é capaz de fixar nitrogênio utilizado pela planta. Em troca, o hospedeiro fornece carboidratos necessários para a manutenção da bactéria (WAREMBOURG & MORRAL, 1978).

O grande grupo de bactérias que infecta e produz nódulos fixadores de nitrogênio nas associações com leguminosas está localizado no gênero *Rhizobium*. Este gênero é representado por organismos nodulantes de uma enorme gama de leguminosas que ocorrem em diversas áreas geográficas e climáticas (NORRIS, 1956).

A atenção para agrupar todos os organismos nodu-

lantes de plantas em somente um gênero causou confusão e muita insatisfação com a classificação do *Rhizobium*. TRINICK (1973) encontrou o *Rhizobium* nodulando eficientemente uma planta da família Ulmaceae, *Trema aspera*, negando assim a definição original do *Rhizobium*. JORDAN e ALLEN (1974) consideram a família Rhizobiaceae com dois gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium*, os quais possuem habilidade para causar hipertrofias corticais nas plantas, embora estas estruturas sejam bastante diferentes.

O *Rhizobium* é uma bactéria bastante regular, móvel quando jovem, gram-negativa, que mede de 1,2 a 3,0 μ m de comprimento e de 0,5 a 0,9 μ m da largura, heterotrófica e aeróbica. Em geral desenvolve-se a temperatura de 25 a 30°C e tolera variações de pH entre 6,0 e 7,0 (VINCENT, 1974 e 1975). O *Rhizobium* pode viver livremente no solo como um heterotrófico aeróbico, ou ainda simbioticamente no nódulo, sob condições quase anaeróbicas (NUTMAN, 1972).

Usualmente um nódulo é ocupado por uma única cepa de *Rhizobium* mas há reportagens de representação dupla por diferentes cepas de *Rhizobium* similares no mesmo nódulo (LINDELMANN et alii, 1974).

2.2. INCIDÊNCIA DE NODULAÇÃO

A família Leguminosae, com aproximadamente 700 gêneros e 18.000 espécies tem sido considerada a terceira grande família das plantas com flores. Divide-se em três subfamílias, Caesalpinoideae e Mimosoideae, cada qual com 2.800 espécies e a Papilionoideae com 12.000 espécies. As subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae apresentam 90% de nodulação enquanto que somente 30% é observado na Caesalpinoideae (ALLEN & BALDWIN, 1954).

2.3. ASPECTOS GERAIS DA LIGAÇÃO SIMBIÓTICA

A primeira etapa no estabelecimento da simbiose bactéria-leguminosa é a infecção da planta hospedeira por uma espécie do gênero *Rhizobium*. Esta infecção é uma associação íntima que depende em seu total de um reconhecimento mutuamente específico para uma fixação efetiva (HAMBLIN & KENT, 1973; DAZZO & BRILL, 1979 e STACEY et alii, 1980).

Uma indicação visível da interação bactéria-planta é a formação dos nódulos radiculares que requer etapas iniciais como reconhecimento entre a célula bacteriana e a raiz da planta (BOHLOOL & SCHMIDT, 1974; DAZZO & HUBBELL, 1975; DAZZO et alii, 1976; BHUVANESWARI & BAUER, 1978 e SCHMIDT, 1979),

ligação da bactéria à superfície radicular (DAZZO et alii, 1976; SCHMIDT, 1979 e DAZZO et alii, 1984), curvamento dos pelos radiculares através de exudatos bacterianos (HUBBELL, 1970; NAPOLI & HUBBELL, 1975 e YAO & VINCENT, 1976) e formação do canal de infecção (CALLAHAM & TORREY, 1981) que conduz o *Rhizobium* para a célula da raiz. A penetração da bactéria parece ocorrer por invaginação sem lise da célula hospedeira (NAPOLI & HUBBELL, 1975 e CALLAHAM & TORREY, 1981). Segue-se o desenvolvimento dos bacterioides (URBAN & DAZZO, 1982), diferenciação do tecido nodular (TRUCHET et alii, 1980), síntese de leghemoglobina (VERMA et alii, 1979), síntese e expressão da nitrogenase (GRESSHOFF et alii, 1981) e mecanismos de troca de metabólitos e energia entre a leguminosa e o bacterióide *Rhizobium* (WAREMBOURG & MORRAL, 1978).

2.4. LECTINAS

2.4.1. Introdução

Enquanto estudava a toxicidade de extratos de mamona (*Ricinus communis*), Stillmark fez uma observação inicial de que extratos de feijão aglutinavam eritrócitos. Adicionalmente ele mostrou que o material causador da aglutinação era uma proteína e deu-lhe o nome de ricina (STILLMARK, 1888, Stillmark, H. Über rizin giftiges ferment aus den samen von ricinus communis, L. und einigem Euphorbiaceen, 1888.

citado em SHARON & LIS, 1987). *[] As aglutininas ou fitoaglutininas como eram chamadas, foram detectadas em outras espécies de plantas (TOMS e WESTERN, 1971).

* [Posteriormente foi introduzido o termo lectina, de origem latina significando selecionar ou escolher (BOYD & SHAPLEIGH, 1954) o qual permaneceu até os dias de hoje].

As pesquisas direcionadas às lectinas têm se desenvolvido bastante e hoje elas tem sido detectadas em muitas famílias de plantas, desde fungos e líquens até plantas superiores e também em animais como esponjas, crustáceos, moluscos, peixes, ovos de anfíbios e tecidos de mamíferos (JAFFÉ, 1980).

2.4.2. Histórico

Após a descoberta das lectinas, Landsteiner e Raubitschek (citados em SHARON & LIS, 1987), demonstraram sua seletividade quando testadas com eritrócitos de diferentes animais e compararam esta seletividade com anticorpos do soro do sangue dos animais. Por exemplo, extrato de ervilha foi mais efetivo na aglutinação de eritrócitos de coelho mas muito menos efetivo com eritrócitos de carneiro ou pombo, ao passo que células vermelhas do sangue humano foram fortemente aglutinadas por extratos de feijão e fracamente aglutinadas por extrato

Landsteiner K. e H. Raubitschek. Beobachtungen über hämolyse und hamagglutination. 1908.

de ervilha ou lentilha.

Durante um longo período, as fitohemaglutininas parece que deixaram de ser alvo das investigações científicas. Nesta época, somente o trabalho de SUMMER & HOWELL (1936) mereceu atenção. Estes autores conseguiram isolar e mostrar que a Concanavalina A (Con A), uma proteína do feijão-de-porco, *Canavalia ensiformes* era uma fitohemaglutinina e apresentava um alto poder aglutinante para eritrócitos de cavalo numa concentração muito baixa.

Os trabalhos clássicos que marcaram a nova era das pesquisas com fitoaglutininas foram os de RENKONEN (1948) e BOYD & REGUERA (1949). Estes autores trabalharam com sementes de várias espécies de leguminosas e verificaram que estas apresentavam especificidade para amostras de sangue humano pertencentes aos diferentes grupos sanguíneos. A partir de então as aglutininas de plantas passaram a ser utilizadas como reagantes na tipagem sanguínea e em investigações de base química da especificidade de grupos sanguíneos (BIRD, 1959 e ALLEN & BRILLIANTINE, 1969). ALLEN & BRILLIANTINE (1969) verificaram em seus estudos que ocorriam, com frequência, aglutininas específicas e não específicas para eritrócitos de diferentes grupos sanguíneos. Analisaram 2663 amostras de sementes e verificaram que destas, 711 não foram específicas para qualquer grupo sanguíneo.

Ainda neste período, JAFFÉ (1969) verificou que as aglutininas que não eram específicas para eritrócitos humanos poderiam ser específicas para eritrócitos de diferentes espécies animais. Este fato também foi enfatizado por TOMS & WESTERN (1971) que verificaram por exemplo, que algumas lectinas de *Phaseolus vulgaris* eram específicas para eritrócitos de frango, cobaia, coelho e carneiro. JAFFÉ et alii, (1972) estudaram a atividade eritroaglutinante de um grande número de cultivares e variedades de *Phaseolus vulgaris* com relação à sua ação sobre eritrócitos humanos dos grupos A, B e O, sangue de coelho e de vaca tratados com tripsina ou pronase e as variedades e cultivares foram agrupadas em quatro grupos:

Grupo A: Somente não aglutinou eritrócitos de vaca não tratados com tripsina.

Grupo B: Não aglutinou eritrócitos de vaca tratados ou não com tripsina.

Grupo C: Aglutinou somente eritrócitos de vaca tratados com tripsina.

Grupo D: Aglutinou somente eritrócitos de criceto tratados com pronase.

CALLOW (1975) definiu lectinas como proteínas ou glicoproteínas, de plantas, animais e bactérias, que se li-

gam à superfície das células através de sítios receptores específicos contendo carboidratos. Mais recentemente as lectinas foram definidas como proteínas ou glicoproteínas ligantes de açúcares de origem não imune, livres de atividade enzimática para açúcares aos quais elas se ligam e que não requerem grupos glicosídicos hidroxílicos livres nesses açúcares para suas ligações (KOCOUREK & KOREJSI, 1981).

As lectinas que atualmente são mais utilizadas estão listadas no quadro a seguir.

Lectinas mais frequentemente utilizadas (RUDIGER, 1984).

Abreviação	Nome	Planta	Açúcar(es) ligante(s)
Con A	Concanavalina A	jack bean (feijão de porco) (<i>Canavalia ensiformes</i>)	manose, gl <u>u</u> cose
PHA	Fitohemaglutina	kidney bean (feijão verde) (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	complexo o-ligo <u>sacari</u> dico.
SBA	Aglutinina de soja	soybean (soja) (<i>Glyxine max</i>)	N-acetil galactosamina galactose
PNA	Aglutinina de amendoim	peanut (amendoim) (<i>Arachis hipogae</i>)	N-acetil galactosamina galactose
WGA	Aglutinina de germe de trigo	wheat (trigo) (<i>Triticum vulgaris</i>)	oligomero de N-acetil gl <u>u</u> cosamina
RCA	Ricina ou aglutinina de mamona.	castor bean (mamona) (<i>Ricinus communis</i>)	galactose

2.4.3. Localização na planta

Já estava estabelecido há muito tempo que a melhor fonte de aglutininas era as sementes das plantas superiores (CALLOW, 1975).

Surgiram então os trabalhos de localização celular. Lectinas de *Phaseolus vulgaris* foram encontradas no citoplasma de células cotiledonares e embrionárias (MIALONIER et alii, 1973). Posteriormente elas foram encontradas ao redor de grãos de amido e dos corpos protéicos (CLARKE et alii, 1975 e PUSZTAI et alii, 1977). Em 1975, BOWLES & KAUSS verificaram a presença de lectinas nas membranas e sugeriram que elas podiam ser parte integrante das membranas e desempenhar algum papel no contato e fusão das membranas. HAMBLIN & KENT (1973) mostraram em seus estudos a presença de lectinas em pelos absorventes e primórdios radiculares de *Phaseolus vulgaris*. FOUNTAIN et alii (1977) verificaram a liberação da lectina no meio de germinação de sementes de soja, teoria subsequentemente corroborada e estendida por HWANG et alii (1978) e por CAUSSE & BROUGÉ (1983). DAZZO & HRABAK (1981) mostraram a presença de trifoliin A, a lectina do trevo branco, nos esudatos radiculares do trevo, sugerindo desta forma que as lectinas não são meramente componentes intracelulares ou ligantes de superfícies, mas também são liberadas durante a germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas no meio circundante.

2.4.4. Papel Biológico

Para uma melhor investigação das atividades das lectinas era necessário que elas fossem isoladas e purificadas.

Os estudos de purificação de aglutininas começaram cedo, porém sem muito sucesso. As primeiras purificações eram apenas parciais e isolamentos e purificações completas só foram obtidas com a cristalização de Concanavalina A, Con A (SUMMER, 1919). As pesquisas prosseguiram e somente em 1952 é que outras aglutininas foram relativamente purificadas através do método de precipitação com sulfato de amônio e mudanças de pH (LIENER & PALLANSCH, 1952; WATKINS & MORGAN, 1952; RIGAS & OSGOOD, 1955 e JAFFÉ & GAEDE, 1959). Outras técnicas bioquímicas surgiram nesta época, como a cromatografia de troca iônica (TAKAHASHI et alii, 1967; DAHLGREN et alii, 1970; ENTLICHER et alii, 1970; STEIN & SAGE, 1972; ALLEN et alii, 1973; SELA et alii, 1973 e ANDREWS, 1974) e eletroforese de fluxo livre (JAFFÉ & HARMING, 1965 e PUSZTAI & WATT, 1974).

Surgem ainda nesse período as pesquisas relevantes de AGRAWAL & GOLDSTEIN (1967) e OLSON & LIENER (1967) estimulando o desenvolvimento da cromatografia de afinidade (PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1979) sem dúvidas um passo muito importante para a purificação das lectinas. A cromatografia de afinidade está hoje bastante desenvolvida e através dela muito

pode ser conhecido a respeito das lectinas. Somente desta forma foi possível uma definição mais clara e objetiva das funções das lectinas.

As propriedades e efeitos biológicos das lectinas, têm sido bem documentadas e discutidas em recentes revisões (GOLDSTEIN & HAYES, 1978 LIS & SHARON, 1981).

Há muito tempo é conhecido que algumas sementes cruas de leguminosas, por exemplo *Phaseolus vulgaris*, são tóxicas (JAFFÉ, 1980) devido a presença de lectinas. Aglutininas de soja (LIENER, 1953), *Phaseolus vulgaris* (JAFFÉ & GAEDE, 1959) e feijão de porco (JAYNE-WILLIAMS, 1978) inibiam o crescimento de animais, quando estavam presentes em suas dietas (JAFFÉ & VEGALLETTE (1968) verificaram que extratos protéicos de algumas cultivares de *Phaseolus vulgaris* com atividade aglutinante contra sangue de vaca tratado com tripsina inibiam o crescimento de ratos, enquanto que quando cultivares sem atividade aglutinante eram utilizadas, o crescimento era normal. JANSEN et alii (1976) mostraram que larvas de insetos morriam com a adição de lectina de *Phaseolus vulgaris* em suas dietas normais, o mesmo acontecendo com outros animais.

Surgiram várias explicações a respeito do assunto. A primeira delas, defendida a muito por JAFFÉ (1969) que a hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* combina com células da superfície da parede intestinal dos animais, causando uma

interferência não específica com a absorção de nutrientes. Outra explicação sugerida por JAYNE-WILLIAMS (1978) e apoiada por LIENER (1981) é a de que as lectinas de *Phaseolus vulgaris* reagem com a superfície da mucosa intestinal, destruindo-a, permitindo desta forma uma penetração e infecção bacteriana sistêmica que poderiam ser letais.

Algumas lectinas purificadas de feijão possuem uma atividade mitogênica (TAKAHASHI et alii, 1967; DAHLGREEN et alii, 1970; WEBER et alii, 1972 e ALLEN et alii, 1973) isto é, podem estimular o crescimento e divisão de linfócitos.

Nas plantas de onde a maioria das lectinas é derivada, os estudos sobre suas funções ainda são pouco conclusivos.

Alguns autores sugerem que elas podem ligar-se a carboidratos e desta forma atuar no transporte dos mesmos ou sua deposição nas sementes (LIENER, 1964). Outros estudos mostraram ainda que as aglutininas podem atuar como estimulante mitogênico de células embrionárias vegetais (HOWARD et alii, 1972). O isolamento de lectinas das membranas celulares do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* sugeriu que elas podiam fazer parte integrante das membranas e desempenharem algum papel no contato e fusão das membranas vegetais (BOWLES & KAUSS, 1975). Por figurarem uma grande porcentagem das proteínas totais das sementes das leguminosas, tem sido sugerido que as lectinas atuam como proteínas de reserva (LIENER, 1964 e HAGUE,

1975). Segundo alguns autores as lectinas poderiam exibir um papel de proteção às plantas. MIRELMAN et alii (1975) e CALLOW (1977) verificaram que ocorre uma inibição no crescimento e germinação da hifa de *Trichoderma viride* quando lectinas do germe de trigo ou batata estão presentes. Similarmente, a presença de lectina na rizosfera de plantas jovens de trigo deve ter um efeito fungicida (MISHKIND et alii, 1980). Outra função das lectinas é que elas podem atuar como "proteínas de reconhecimento" no posicionamento de carboidratos na parede celular e/ou regulação do crescimento da mesma (KAUSS & GLASER, 1974).

Alguns pesquisadores estão voltando a atenção para a liberação da lectina durante a germinação da semente, no envolvimento de um possível papel ecológico de cada componente durante a embebição da semente e o desenvolvimento inicial da plântula. SHERWOOD et alii (1984) trabalhando com trifoliin A, a lectina de *Trifolium repens*, verificaram que a trifoliin A da semente é degradada no caule durante o desenvolvimento da plântula, enquanto a trifoliin formada na raiz é excretada para a superfície radicular e o meio externo. Outros autores (CAUSSE et alii, 1985) estudaram o possível envolvimento da ligação entre lectina de soja e frações dos principais colóides do solo.

As lectinas também podem ligar-se às bactérias e esta interação foi sugerida por HAMBLIN & KENT (1973) como a base para a ligação do *Rhizobium* às raízes de leguminosas.

A primeira etapa da interação bactéria-planta é a ligação da bactéria às raízes e a primeira indicação da presença de lectina nas raízes foi observada há muito tempo (para referências ver Jaffé, 1980) e foram detectadas posteriormente nos nódulos radiculares.

HAMBLIN & KENT (1973) mostraram em seus experimentos que células do sangue se ligaram às raízes jovens de leguminosas e que o *Rhizobium* que fora incubado com extrato de sementes de *Phaseolus vulgaris* contendo lectina, poderiam ligar-se às células vermelhas do sangue. Concluíram então que as raízes jovens continham potenciais de se ligarem às bactérias.

Outros pesquisadores seguiram esta mesma linha de pesquisa. DAZZO et alii (1978) verificaram que a lectina do trevo branco na superfície do pelo radicular toma um importante papel no reconhecimento do *R. trifolii* pelo trevo. Em 1981, o grupo de KATO (KATO et alii, 1981) sugeriu que o reconhecimento do hospedeiro na simbiose *Rhizobium*-ervilha é baseado na interação entre células rizobiais e a lectina do hospedeiro.

Porém, em 1984, LAW & STRIJDOM trabalhando com *Lotononis bainesii* verificaram que não há evidências de interação entre a lectina da semente de *Lotononis bainesii* e as estirpes de *Rhizobium* testadas, verificando que a ligação só foi possível quando lectina da raiz era utilizada (LAW & STRIJDOM,

1984b).

Recentemente, atenção especial tem sido direcionada à ocorrência de lectinas nas raízes. Este ponto é de extrema importância para suportar a hipótese de que as lectinas desempenham algum papel no estabelecimento e/ou manutenção da bem conhecida simbiose *Rhizobium* -leguminosa. Porém os trabalhos a respeito são as vezes contraditórios.

Trabalhando com raízes de sanfeno, HAPNER & ROBBINS (1979) verificaram que a lectina da raiz é idêntica à lectina da semente desta planta. Outros pesquisadores isolaram de raízes de ervilha quantidades mínimas de proteínas que são relacionadas às lectinas das sementes, porém não são idênticas (GATEHOUSE & BOULTER, 1980). Pouco mais tarde, trabalhando com soja, GADE et alii (1981) verificaram que a lectina da raiz assemelha-se muito com a lectina da semente. Neste mesmo ano, lectina isolada de uma solução que foi banhada de raízes de ervilha em tampão ácido foi similar à lectina da semente na especificidade de ligar-se a açúcares (KATO et alii, 1981). Por outro lado, alguns autores descreveram diferenças claras entre a lectina da raiz e da semente de *Lotononis bainesii* (LAW & STRIJDOM, 1982). Estes autores verificaram também que não existem evidências de que a raiz de *L. bainesii* tenha material antígenicamente relacionado à lectina da semente (LAW & STRIJDOM, 1984a). Mais recentemente trabalhos mostram que a lectina exudada da raiz de soja é geneticamente distinta da lectina da

semente e aparentemente é a lectina da raiz que está envolvida na nodulação (HALVERSON & STACEY, 1985).

2.4.5. Lectinas: a base da especificidade

O sucesso da relação simbiótica entre bactérias e plantas é caracterizado por um alto grau de seletividade hospeiro-simbionte. A função das lectinas na determinação da especificidade no sistema simbiótico leguminosa-*Rhizobium* foi discutido.

Evidências de especificidade foram encontradas para soja (BOHLOOL & SCHMIDT, 1974), cuja lectina só foi capaz de ligar-se a estirpes infectantes de *Rhizobium japonicum*, o simbiote da soja, entretanto a mesma lectina não foi capaz de ligar-se a nenhuma das outras estirpes testadas de *Rhizobium* que não nodularam soja.

Porém, logo depois, DAZZO & HUBBELL (1975) verificaram que a Concanavalina A, a lectina do feijão-de-porco, combinou fortemente com várias estirpes de *Rhizobium* independentemente de seus respectivos hospedeiros. Então concluíram que as interações entre lectinas de leguminosas e células de *Rhizobium* podiam nem sempre justificar a especificidade expressa pelo nódulo bacteriano de suas leguminosas hospedeiras.

Em 1976, WOLPERT & ALBERSHEIM verificaram que o

lipopolissacarídeo do antígeno O de quatro estirpes de *Rhizobium japonicum* ligou-se à lectina do simbionte, a soja, que tinha se ligado covalentemente à sacarose. Entretanto, ele não reagiu com lectinas de outras leguminosas testadas. Por esta razão, o estabelecimento do sucesso da relação simbiótica, foi atribuído à interação seletiva entre as lectinas do hospedeiro com o antígeno O do simbionte.

Estudando a habilidade de lectinas marcadas com fluoresceína isotiocianato (FITC) derivadas de cinco leguminosas diferentes para reagirem com estirpes de *Rhizobium* spp., LAW & STRIJDOM (1977) encontraram resultados mostrando que com exceção de seis das dez estirpes de *R. phaseoli* e duas das dez estirpes de *R. japonicum*, nenhuma das estirpes testadas foram hábeis para ligar lectinas de sua planta hospedeira normal. Verificaram ainda que muitas espécies de *R. trifolii*, *R. leguminosarum* e *R. phaseoli* ligaram-se a cada uma das lectinas das plantas estudadas, concluindo então que as lectinas de plantas não tem um importante papel na especificidade do *Rhizobium*.

Ao mesmo tempo, DAZZO BRILL (1977) examinaram, através de microscopia de fluorescência, sitios nas raízes do trêvo branco e alfafa que ligam-se a polissacarídeos capsulares de *R. trifolii* e *R. meliloti*, respectivamente. Pelos resultados obtidos eles concluíram que pelos radiculares de alfafa e trêvo são especificamente ligantes a polissacarídeos capsulares de *R. meliloti* e *R. trifolii* respectivamente.

Aglutinina purificada de sementes e raízes de trevo branco aglutinou especificamente *R. trifolii*, para concentrações tão baixas como 0,2µg proteína/ml. Anticorpos para trifoliin purificada ligaram-se à região dos pelos radiculares de plântulas de trevo, mas não se ligaram à alfafa e outras plantas testadas. Com estes resultados, DAZZO e colaboradores, (DAZZO et alii, 1978) propuseram que trifoliin na superfície do pelo radicular exerce um importante papel no reconhecimento do *R. trifolii* pelo trevo.

Estudos de imunofluorescência, imunoprecipitação quantitativa, inibição da aglutinação bacteriana e hemaglutinação passiva realizados por DAZZO & BRILL (1979) indicaram que os determinantes antigênicos da reação cruzada *R. trifolii*-trevo estavam presentes na superfície do *R. trifolii* nas raízes do trevo e eram imuniquimicamente únicos para este grupo de inoculação. A lectina multivalente trifoliin e o anticorpo para o determinante antigênico da raiz do trevo ligaram-se competitivamente a dois heteropolissacarídeos ácidos isolados do material capsular de *R. trifolii* 0403. Pelos resultados eles sugeriram que estes polissacarídeos ligam *R. trifolii* à extremidade do pelo radicular do trevo que contém trifoliin.

Conclusões importantes foram relatadas por WONG (1980). Ele verificou que lectinas de ervilha, lentilha, *Vicia faba* e *Canavalia ensiformes* têm propriedades açúcares-ligantes similares porém diferentes propriedades físicas. A ligação des

tas lectinas às várias estirpes de *Rhizobium* indicam que a ligação da lectina ao *Rhizobium* é determinada não somente pela especificidade pelo açúcar mas também pelas características físicas. Através da inibição da ligação lectina-*Rhizobium* por açúcares WONG (1980) também concluiu que o sítio ligante da lectina de lentilha para *R. japonicum* é diferente do sítio ligante da lectina de soja para *R. japonicum*.

Através de aglutinação bacteriana da lectina de *Phaseolus coccineus* e cepas de *R. phaseoli* obteve-se resultados demonstrando que a lectina é capaz de unir-se seletivamente à superfície de bactérias de algumas cepas de *Rhizobium* testadas. Os resultados obtidos demonstraram a especificidade da interação entre lectinas de plantas e bactérias. Sugeriu-se também o uso da metodologia utilizada para a seleção de cepas que infectam as variedades de plantas de onde se obteve a lectina (ESTRADA-GARCIA et alii, 1984).

Duas técnicas utilizadas para avaliar a ligação do *Rhizobium* às raízes do trevo, contagem indireta após radio-marcagem das bactérias e contagem direta pelo uso de microscopia de contraste de fases, mostraram resultados sem indicações de especificidade na ligação do *R. trifolii* às raízes do trevo. Os resultados de inibição da ligação *Rhizobium*-raiz sugeriram que a ponte lectina não é uma etapa obrigatória na iniciação da infecção (JONES et alii, 1985). No trabalho acima descrito o grupo de JONES verificou que ausência ou presença

de plasmídeo simbiótico não estava relacionada com a aderência da bactéria à raiz da planta hospedeira. Uma vez que as funções de especificidade do hospedeiro são carregadas neste plasmídeo, sugeriu-se que a ligação do *Rhizobium* à raiz da leguminosa não é baseada na especificidade do hospedeiro (JONES et alii, 1985).

Utilizando-se da competição entre cepas para aderir-se às raízes de alfafa, ANOLLÉS et alii (1984) verificaram que a especificidade de *R. meliloti* por raízes de alfafa se manifesta pela capacidade de unir-se a sítios seletivos na raiz, excluindo outros *Rhizobium*. Finalmente eles concluíram que a adesão aos sítios específicos está geneticamente determinada no *Rhizobium* e constitui-se num passo obrigatório de reconhecimento na associação simbiótica.

As evidências resumidas aqui indicam que a especificidade hospedeiro-*Rhizobium* pode ser resultante de diferenças entre a lectina das espécies da planta hospedeira e/ou superfície da bactéria. Diferenças lectínicas, têm sido encontradas entre cultivares de feijão (JAFFÉ et alii, 1972). No estudo de cultivares brasileiras, diferenças lectínicas também têm sido detectadas (CARVALHO, 1981; ROMANI, 1983 e CARVALHO & DERBYSHIRE, 1985) e é importante determinar até que ponto essas diferenças contribuem para a especificidade de cultivares de feijão com o *Rhizobium phaseoli*, e quais os fatores que podem interferir nessa ligação.

2.4.6. Fatores que influenciam a ligação *Rhizobium*-lectina

Trabalhos relevantes foram feitos mostrando que as propriedades lectina-ligante das estirpes de *Rhizobium japonicum* mudam substancialmente com a idade da cultura (BHUVANESWARI et alii, 1977; MORT & BAUER, 1980 e TRUCHET et alii, 1983). CHAHAL & VILKHU (1986) também verificaram a existência de uma correlação positiva entre ligação lectínica e idade da cultura de várias estirpes de *Rhizobium*.

O grupo de BHUVANESWARI trabalhou com lectinas de soja altamente purificada e marcada com fluoresceína (FITC-SBL) ou trítio (^3H -SBL). A porcentagem de células na população que exibiu fluoresceína após a exposição de FITC-SBL variou entre 0-70%. O número médio de moléculas de sementes de soja ligados por célula variou entre $0,2 \times 10^6$. Os autores citados verificaram então que a maior parte das estirpes tiveram mais alta porcentagem de células SBL-positivas e o máximo número de sítios ligantes SBL por células nas fases inicial e logarítmica de desenvolvimento (BHUVANESHARI, et alii, 1977).

Através da análise da inibição da hemaglutinação, TSIEN & SCHMIDT (1980) estimaram a presença da ligação lipopolissacarídeo-lectina de soja em culturas de *R. japonicum*. Estes pesquisadores concluíram que a lectina ligante do lipopolissacarídeo se fez presente em todas as preparações, tanto na

fase exponencial como na fase estacionária de desenvolvimento.

Porém neste mesmo ano, MORT & BAUER (1980) verificaram que à medida que a cultura se desenvolve da fase log precoce para a tardia há uma redução de quase 50% na porcentagem de células encapsuladas. Como somente células encapsuladas ligam-se à lectina concluíram que a perda de encapsulação foi suficiente para explicar a perda da capacidade de ligação durante o desenvolvimento de culturas de *R. japonicum*. Eles concluíram também, que a idade da cultura está relacionada à composição química dos polissacarídeos capsular e extracelular de *R. japonicum*, fator este que determina a habilidade da bactéria para ligar-se à lectina da semente de soja.

Estes resultados foram recentemente confirmados por outros pesquisadores que concluíram que a ligação entre a lectina de ervilha marcada com fluoresceína e representantes de várias estirpes de *Rhizobium* correlaciona-se positivamente com a encapsulação e que o máximo de ligação e encapsulação foi observado durante a fase logaritmica das culturas (CHAHAL & VILKHU, 1986).

Mais observações confirmando os resultados de Bhuvaneswari (BHUVANESWARI et alii, 1977) foram obtidos por TRUCHET et alii (1983). Estes pesquisadores examinaram as principais condições para aglutinação de *R. japonicum* por lectinas da semente de soja marcada com fluoresceína e concluíram que a capacidade das células para serem aglutinadas foi

passageira e ótima para culturas desenvolvidas durante quatro -cinco dias.

Existem ainda alguns trabalhos que dizem que o ambiente fornecido às raízes da planta é um importante fator para haver a ligação *Rhizobium*-lectina. Com este propósito BHUVANESWARI & BAUER (1978) verificaram em seus estudos que todas as onze estirpes de *Rhizobium japonicum* desenvolveram receptores específicos para lectina de soja quando cultivadas em exudados de raízes de soja e na associação com raízes de plântulas de soja crescidas em solução hidropônica ou em solos de argila montmorinólita corrigida (turfa). Porém, seis das onze estirpes testadas não desenvolveram receptores quando cultivadas em meios com sais sintéticos. O grupo de Sherwood (Sherwood et alii, 1984) verificou que o excesso de nitrato durante o desenvolvimento da plântula não reprimiu a síntese de trifoliin A, a lectina do trevo branco, na raiz, mas afetou a distribuição e atividade da lectina sintetizada, a ponto de reduzir sua habilidade para interagir com o *R. trifolii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foram utilizadas para a realização deste trabalho sementes maduras e sadias de *Phaseolus vulgaris* obtidas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). As sementes foram estocadas a 4°C.

Culturas de *Rhizobium phaseoli* estirpes C-05 e CIAT 1899 foram derivadas de culturas estoques mantidas na Seção de Microbiologia de Solos (CENA-USP) em tubos de agar inclinado a 4°C.

Sangue humano, do grupo A, Rh positivo, de doador sadio, foi recebido em citrato de sódio 4%, conservado através de tratamento com glutaraldeído e mantido a 4°C.

Sangue de vaca sã, criada na seção de Ciências Animais (CENA-USP), foi recebido em solução de heparina, tratado com tripsina, conservado com glutaraldeído e estocado a 4°C.

As substâncias químicas utilizadas foram de grau analítico ou eletroforético.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Curvas de crescimento de *R. phaseoli*, estirpes CIAT 1899 e C-05

A bactéria obtida de estoques mantidos no CENA, foi estabilizada em meio líquido definido de FRED et alii (1932). O número de células durante o desenvolvimento da cultura foi determinado através de dois métodos.

3.2.1.1. Método colorimétrico

É um método para contagem de células vivas. O cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) é reduzido na cadeia respiratória da bactéria produzindo coloração às células (dados não publicados).

Imediatamente após a inoculação da bactéria em meio líquido (inóculo inicial) foi retirado 1ml da suspensão ao qual adicionou-se 9,0ml de meio líquido. O material foi agitado e 0,1ml de TTC 10% foi adicionado. Incubou-se durante 24 horas, no escuro e à temperatura ambiente. Passadas 24 horas procedeu-se da seguinte forma:

- . foram retirados 3,0ml da amostra e estes foram centrifugados a 10.000xg durante aproximadamente oito minutos.
- . o sobrenadante foi desprezado, coletando-se apenas o precipitado, contendo células.
- . as células foram ressuspensas em 3,0ml de metanol, agitadas e novamente centrifugadas por mais oito minutos.
- . o sobrenadante foi levado ao espectrofotômetro para contagem.

Repetiu-se estas operações em diferentes épocas do desenvolvimento bacteriano.

Os dados obtidos foram avaliados juntamente com os resultados do método do plaqueamento.

3.2.1.2. Método do plaqueamento

Para o experimento foram utilizados tubos de ensaio contendo 9,0ml de solução salina 0,85%, pipetas de 1,0ml e placas de Petri contendo 30ml de meio sólido definido (FRED et alii, 1932). Todo este material foi esterilizado para uso.

O procedimento utilizado é descrito no Quadro que se segue:

Observações: Para cada diluição uma nova pipeta foi utilizada como indicado no esquema. As pipetas usadas nas diluições foram as mesmas que transferiram 0,1ml para as placas de Petri.

A suspensão foi succionada com a pipeta até a marcação 1,0ml; seu conteúdo foi descarregado. Esta operação foi repetida 5 vezes para misturar e tomar uma boa amostra da suspensão e também saturar a parede interna da pipeta com bactérias. O nível do líquido (1ml) foi ajustado e a pipeta foi deixada do líquido de forma que sua extremidade inferior tocasse a parede interna do tubo. Posteriormente descarregou-se o conteúdo da pipeta no próximo tubo, deixando a ponta daquela pipeta limpa do líquido de diluição. O número de células das diluições foi contado colocando-se 0,1ml de cada diluição separadamente em placas de Petri. O material foi uniformemente distribuído sobre a placa com auxílio de uma alça, deixando-se crescer a 28°C. O número de células viáveis foi contado com o auxílio de um contador de colônias Dark-field Quebec, modelo 3327.

O plaqueamento foi feito com as estirpes CIAT 1899 e C-05, em vários períodos de desenvolvimento bacteriano.

Simulação da operação de crescimento bacteriano pelo método do plaqueamento:

Operação	Nº frasco	Vol. de diluente	Vol. de susp. no diluente	Vol. susp. na placa	Diluição na placa
Tomar 1ml da suspensão original e colocar no frasco 1 com pipeta 1. Agitar o frasco e com a pipeta 2 retirar 0,1ml e colocar na placa 1.	1	9ml	1ml	0,1ml	10^2
Usar a pipeta 2 para colocar 1ml do frasco 1 no frasco 2. Agitar. Retirar 0,1ml com a pipeta 3 e colocar na placa 2.	2	9ml	1ml	0,1ml	10^3
Usar a pipeta 3 para tomar 1ml do frasco 2 e passar para o frasco 3. Agitar e com a pipeta 4 retirar 0,1ml para colocar na placa 3	3	9ml	1ml	0,1ml	10^4
Proceder desta forma até atingir a diluição desejada					

3.2.2. Proteínas de *Phaseolus vulgaris*

3.2.2.1. Proteínas totais

As proteínas foram extraídas de farinha de cotilédones maduros, em ausência de casca e embrião, em tampão fosfato 0,01M-salina 0,15M, pH 7,0 na proporção de 50mg de farinha/ml de tampão. O material foi mantido em agitação constante durante 20 minutos. A clarificação do mesmo foi feita por centrifugação a 15.000 x g, durante 30 minutos, 4°C. O sobrenadante foi colhido e considerado como extrato bruto (EB) e o precipitado foi descartado.

A concentração protéica do EB foi determinada colorimetricamente (LOWRY et alii, 1951). As proteínas extraídas foram caracterizadas através de testes de eritroaglutinação contra sangue humano e de vaca pré-tratado com tripsina (JAFFÉ et alii, 1972) e através de eletroforese em gel de poli-acrilamida, sob condições ácida e dissociante (LAEMMLI, 1970 e REISFELD et alii, 1962).

3.2.2.2. Fracionamento

A purificação de lectinas foi realizada à par-

tir do fracionamento do extrato bruto de sementes de feijão, através de cromatografia de afinidade, em coluna de Sepharose 4B tiroglobulina.

- Preparo da resina:

Antes de ser utilizada, a resina, Sepharose 4B foi acoplada com tiroglobulina. O procedimento para acoplamento foi realizado seguindo-se instruções dos fabricantes (PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1979). A Sepharose 4B tiroglobulina foi inchada em HCl 10^{-2} M durante quinze minutos. Subsequentemente a Sepharose foi lavada com grande quantidade de HCl 10^{-2} M e posteriormente neutralizada com solução de NaCO₃ 0,1M contendo NaCl 0,5M (tampão acoplante). Após decantação à 4°C o sobrenadante foi desprezado. A tiroglobulina de porco foi dissolvida em tampão acoplante e adicionada à Sepharose ativada. Esta mistura permaneceu em agitação lenta a 4°C por 20 horas. Seguiu-se decantação e lavagem da mistura com tampão acoplante para retirar o material não ligado. A mistura passou ainda por lavagens com etanolamina (1M pH 8,0), tampão acetato (0,1M pH 4,0) e tampão borato (0,1M pH 8,0), estes dois últimos contendo solução com cloreto de sódio (1M). Esta etapa foi realizada a fim de neutralizar grupos ativos remanescentes e remoção da proteína adsorvida não covalente. Após o acoplamento, a resina foi acamada em coluna de tamanho

1,5 x 30 cm à 4°C.

- Isolamento da lectina

O extrato bruto de sementes de feijão foi aplicado à coluna e a mesma lavada com tampão fosfato pH 7,0 durante 10 horas. Posteriormente, as lectinas foram eluídas passando-se pela coluna tampão glicina-HCl 0,05M NaCl pH 3,0.

- Análises

O material eluído da coluna foi submetido a testes de eritroaglutinação contra eritrócitos humanos (JAFFÉ et alii, 1972) e a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições dissociantes (REISFIELD et alii, 1962).

Procedeu-se da mesma forma com proteínas extraídas de sementes de plantas desenvolvidas durante todo o seu ciclo em atmosfera, contendo $^{14}\text{CO}_2$ para obtenção de lectina purificada marcada com ^{14}C .

3.2.3. Atividades aglutinantes das lectinas

3.2.3.1. Contra eritrócitos

A atividade eritroaglutinante das proteínas dos extratos brutos, lectinas purificadas, lectina marcada com ^{14}C , bem como de uma preparação comercial de lectina de *Phaseolus vulgaris*. (PHA-P L. 1800) foi determinada contra eritrócitos humanos e/ou de vaca tratado com tripsina. As amostras foram diluídas seriadamente em placas de aglutinação. Sangue humano 4% conservado em glutaraldeído ou de vaca 4% tratado com tripsina e conservado em glutaraldeído foi adicionado às cavidades das placas de aglutinação. O título de aglutinação de cada amostra, que corresponde ao inverso da maior diluição em que se observa aglutinação, foi determinado. O método foi realizado com a utilização de material "Cooke Engineering Company, Alexandria, Wisconsin.

3.2.3.2. Contra bactérias

Os extratos brutos de cada uma das três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), Carioca, Goiano Precoce e Negro Argel foram separadamente adicionadas a uma

suspensão bacteriana de *Rhizobium phaseoli* estirpes C-05 ou CIAT 1899 com uma concentração de células da ordem de 10^9 células/ml, na proporção de 10ml de suspensão bacteriana para 3,0ml de extrato bruto. O material foi mantido em agitação constante a 28°C durante uma hora. A suspensão foi lavada repetidamente com salina e foi testada a atividade aglutinante do sobrenadante. Quando esta atividade não foi mais detectável, as lavagens prosseguiram por mais duas vezes. O precipitado final foi ressuspenso em 2ml de solução salina e submetido ao teste de aglutinação contra sangue humano 4% conservado com glutaraldeído. O título de aglutinação foi então determinado.

3.2.4. Comparação de dois métodos para avaliação direta da aglutinação *Rhizobium*-lectina

A avaliação da aglutinação de células microbianas por lectinas de feijão, foi efetuada por dois métodos diretos de aglutinação; em placas de microdiluição e em lâminas para microscópio.

As amostras utilizadas foram:

- . extrato bruto de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivar Goiano Precoce (EB Goiano).

- . preparação comercial de lectina de feijão na proporção de 125 μ g proteína/ml de solução salina 0,85% (PHA-P L. 1800).
- . lectina purificada de feijão cultivar Goiano Precoce (lectina purificada).
- . tampão fosfato 0,01M+salina 0,15M, pH 7,0 (controle).
- . suspensão bacteriana: foi utilizada suspensão da bactéria *Rhizobium phaseoli* estirpe CIAT 1899 crescida em cultura líquida.

3.2.4.1. Aglutinação direta em placas de microdiluição

Foram colocados nas cavidades de placas de microdiluição 20 μ l das amostras individualmente e 20 μ l de suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e depois foram analisadas sem o uso de magnificação. A avaliação foi feita com a cultura em diferentes horas de desenvolvimento.

3.2.4.2. Aglutinação direta em lâminas de microscópio

Foram colocados em lâminas de microscópio 10 μ l de amostra e 10 μ l de suspensão bacteriana. As lâminas foram incubadas durante uma hora a temperatura ambiente e depois observadas em microscópio ótico (Micro Star American Optical One-Ten) com o auxílio de imersão e um aumento de 1000 vezes. Cultura bacteriana em diferentes horas de desenvolvimento foi utilizada.

3.2.5. Fatores que podem regular a aglutinação Rhizobium-lectina

3.2.5.1. Determinação da relação entre a concentração de lectina e o número de células bacterianas

Culturas de *R. phaseoli*, CIAT 1899, foram estabilizadas a 28°C em meio líquido definido por FRED et alii (1932), obtidas de culturas estoques mantidas em tubos com agar inclinado. A concentração de células foi ajustada para as concentrações desejadas após cinco dias de desenvolvimento.

As células coletadas foram incubadas com uma preparação comercial de lectina de feijão (PHA) nas proporções de: 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640ng proteína/ 10^6 células, e separadamente com um extrato salino protéico preparado de sementes de feijão cultivar Goiano Precoce nas proporções de 160, 320, 640, 1250, 2500, 5000 e 10000ng proteína/ 10^6 células.

Os testes de aglutinação das células bacterianas, foram estimados visualmente com o auxílio de microscópio ótico. A concentração protéica das amostras foi determinada colorimetricamente pelo método de LOWRY (LOWRY et alii, 1951) usando-se soro albumina bovina como padrão (Figura 1').

3.2.5.2. Determinação da época de desenvolvimento de receptores lectínicos em *R. phaseoli*

Células de *R. phaseoli* CIAT 1899 foram desenvolvidas em meio líquido descrito por FRED et alii (1932).

A incubação com extrato bruto, lectina purificada, da cultivar Goiano Precoce, bem como com uma preparação comercial de lectina de feijão (PHA-P L. 1800) foi feita em lâminas para microscópio em períodos de 0, 6, 15, 24, 27, 32, 40, 44 e 48 horas de desenvolvimento bacteriano. O número de

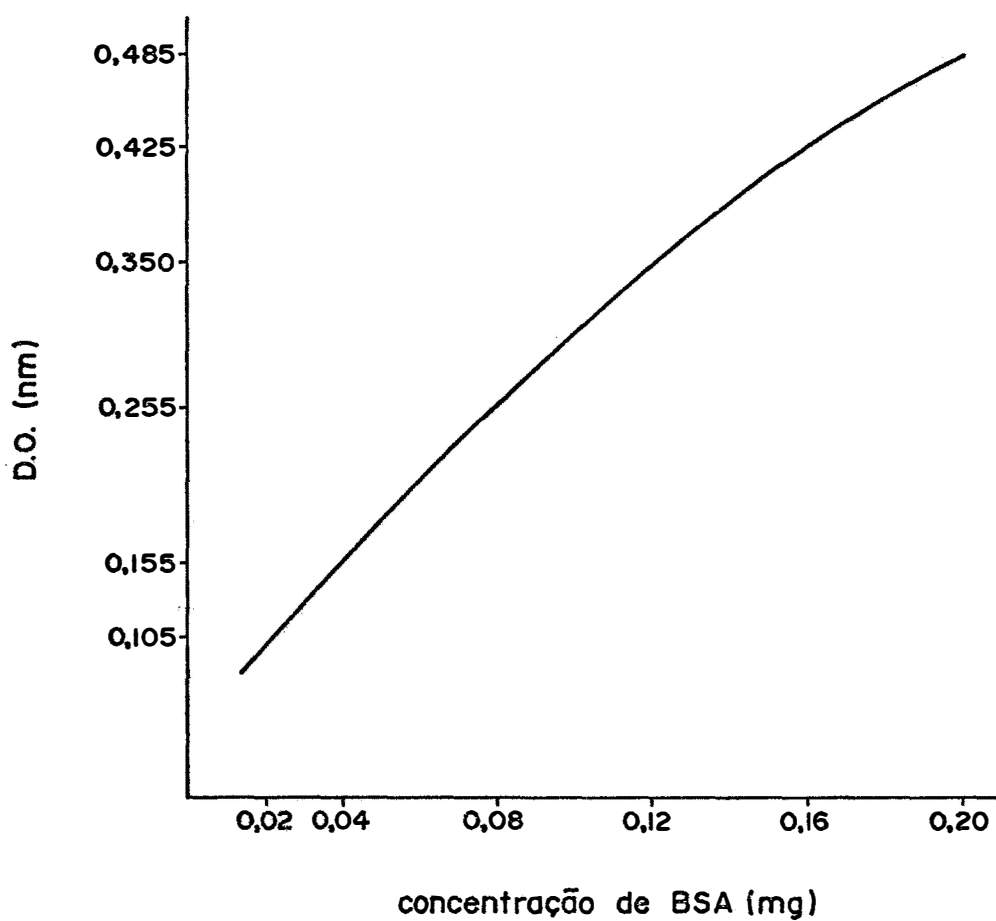


Figura 1. Curva padrão para determinação de proteína solúvel pelo método de Lowry (LOWRY et alii, 1951).

células utilizado foi da ordem de 10^9 células/ml no decorrer de todo o experimento. Para avaliação da aglutinação foi utilizado o método "aglutinação em lâminas para microscópio" já descrito.

3.2.5.3. Interferência do pH na ligação

Rhizobium-lectina

A bactéria simbiote do feijão, *Rhizobium phaseoli* estirpe CIATE 1899, foi crescida durante cinco dias em meio líquido levedura/manitol atingindo uma concentração de 2×10^9 células/ml.

Subsequentemente, o material foi distribuído em quatro frascos e cada qual mantido a pH 3,0; 4,5; 6,5 e 8,0, sendo o pH ajustado com as próprias soluções do meio de cultura.

Separadamente, a cada cinco ml de cultura bacteriana foram adicionados 1,5ml de lectina purificada de feijão, cultivar Negro Argel numa concentração cujo título de aglutinação foi de 256 quando testada com sangue humano 4% tratado com glutaraldeído. Para controle foi utilizado tampão fosfato 0,01M salina 0,15M pH 7,0. Todo o material foi mantido em agitação constante, a temperatura ambiente durante 1 hora. Logo após o material foi centrifugado, durante cinco mi

nutos, 4°C e 10000xg. Foram feitas então várias lavagens do precipitado com meio de cultura líquido cujo pH variava conforme o inicial. Os sobrenadantes sempre foram submetidos a aglutinação de eritrócitos humanos 4% tratados com glutaraldeído. As lavagens foram mantidas até que dois sobrenadantes consecutivos não mais apresentassem atividade eritroaglutinante. Os sobrenadantes sempre tiveram o pH ajustado para 6,8 antes de serem submetidos a eritroaglutinação. O precipitado final foi ressuspenso em 200µl de tampão fosfato 0,01M+ solução salina 0,15M pH 7,0, o seu pH foi ajustado, e seguiu-se o teste de eritroaglutinação. Os precipitados também foram observados no microscópio ótico (Micro-Star/American Optical One-Ten) com aumento de 1000 vezes. Os sobrenadantes das incubações foram submetidos à eletroforese em tubos de gel de poliacrilamida sob condições ácidas e ao teste de LOWRY (LOWRY et alii, 1951).

3.2.6. Determinação da aglutinação através de lectina radiomarcada

Lectina marcada com ^{14}C , foi isolada através de cromatografia de afinidade de extrato bruto de feijão, cultivar Carioca, crescidos em atmosfera contendo $^{14}\text{CO}_2$.
na Seção de Química de Solos (CENA-USP), A atividade agluti-

nante do extrato, bem como da lectina purificada foram analisadas contra eritrócitos humano 4% conservados com glutaraldeído. A lectina purificada foi incubada com *R. phaseoli* CIAT 1899 crescido em meio líquido definido (FRED et alii, 1932) até uma concentração de 2×10^9 células/ml. As concentrações e quantidades de lectinas radiomarcadas, tal como solução salina 0,85% e cultura bacteriana utilizadas são mostradas na Tabela 1.

Após incubação durante uma hora, alíquotas foram retiradas para observação microscópica; o restante foi lavado 3 vezes com meio líquido. O precipitado final ressuspenso em 75µl de solução cintiladora (PPO 4g; POPOP 0,1g; TOLUENO 1 litro e TRITON 0,5ℓ), dividido em triplicata com 15ml de solução cintiladora para contagem em cintilador líquido. Como padrões, utilizou-se solução cintiladora pura, solução cintiladora + lectina e solução cintiladora + solução salina 0,8%.

Tabela 1 - Concentração e quantidade de lectina radiomarcada com ^{14}C , salina e cultura bacteriana utilizadas para incubação.

Concentração lectina - ^{14}C	Quantidade lectina- ^{14}C	Quantidade salina 0,8%	Concentração bacteriana	Quantidade de cultura
$\mu\text{g/ml}$	ml	ml	cél. ($\times 10^{-9}$)	ml
60,0	1,500*	0,000	3,0	1,5
30,0	1,500	0,000	3,0	1,5
10,0	1,000	2,000	6,0	3,0
3,0	0,500	4,500	10,0	5,0
1,0	0,167	4,833	10,0	5,0
0,5	0,083	4,917	10,0	5,0
0,0	0,000	3,000	6,0	3,0
0,0	0,000	5,000	10,0	5,0

* Esta quantidade foi utilizada após concentração da lectina purificada radiomarcada em concentrador de amostras para análises clínicas Mini-con TM_B.

4. RESULTADOS

4.1. DESENVOLVIMENTO DAS CULTURAS DE *Rhizobium phaseoli* ESTIRPES C-05 E CIAT 1899

As curvas de crescimento determinadas pelo método do plaqueamento de ambas as estirpes, C-05 e CIAT 1899, foram exponenciais e demonstraram que há uma fase inicial cujo desenvolvimento bacteriano é lento, uma fase log de crescimento rápido e uma fase estacionária atingida após um período de quatro a seis dias (Figura 2). A curva de desenvolvimento de *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 realizada pelo método colorimétrico exibiu as mesmas características descritas (Figura 3). Os resultados também demonstraram que *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 apresenta na fase log um crescimento mais rápido que a estirpe C-05, atingindo uma concentração de células também mais alta. Devido a estas últimas considerações, *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 foi a mais utilizada durante o decorrer dos experimentos.

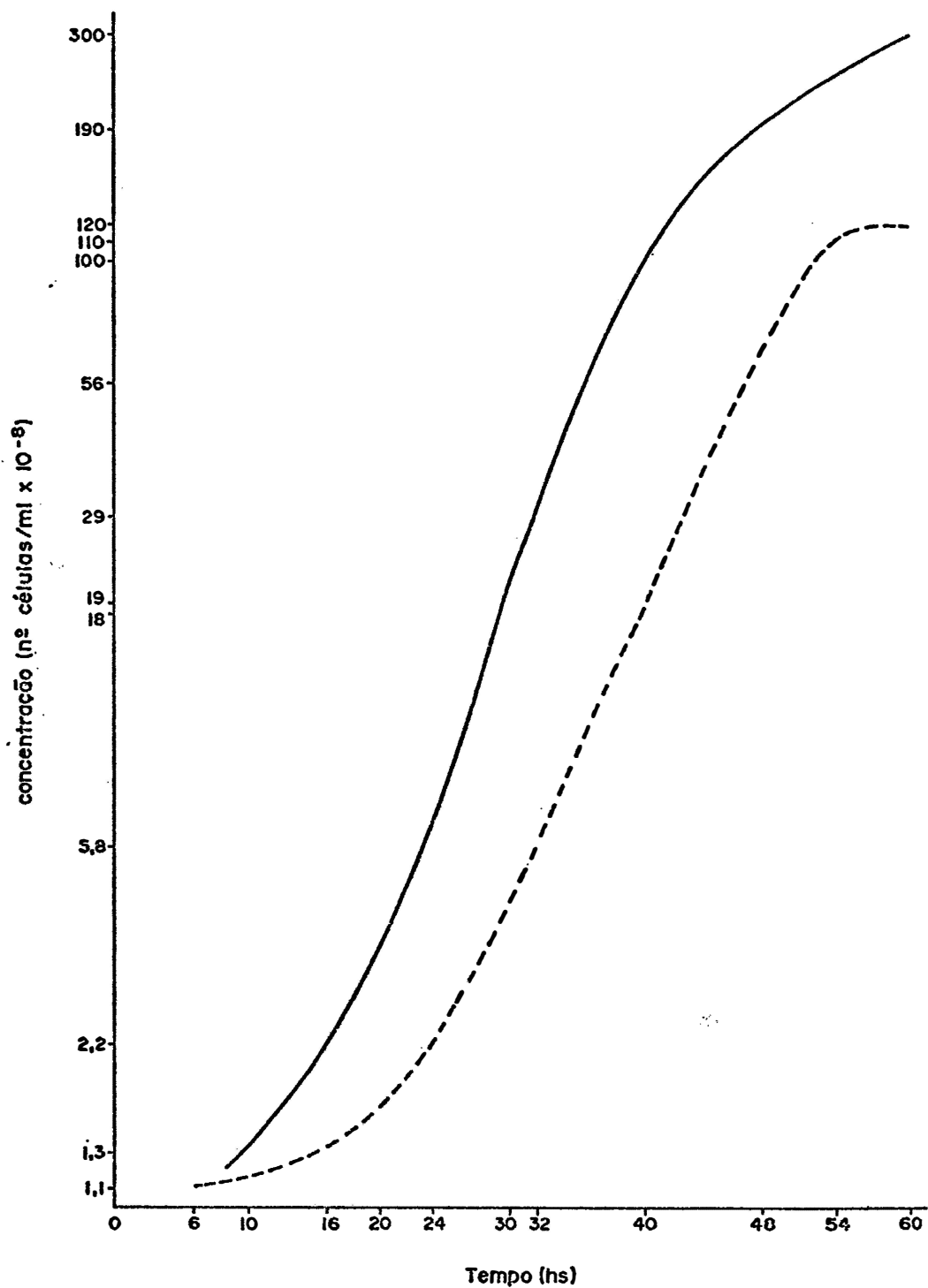


Figura 2 - Curvas de crescimento de *R. phaseoli* estirpes C-05 e CIAT 1899 realizadas pelo método do plaqueamento.

(—) CIAT 1988

(---) C-05

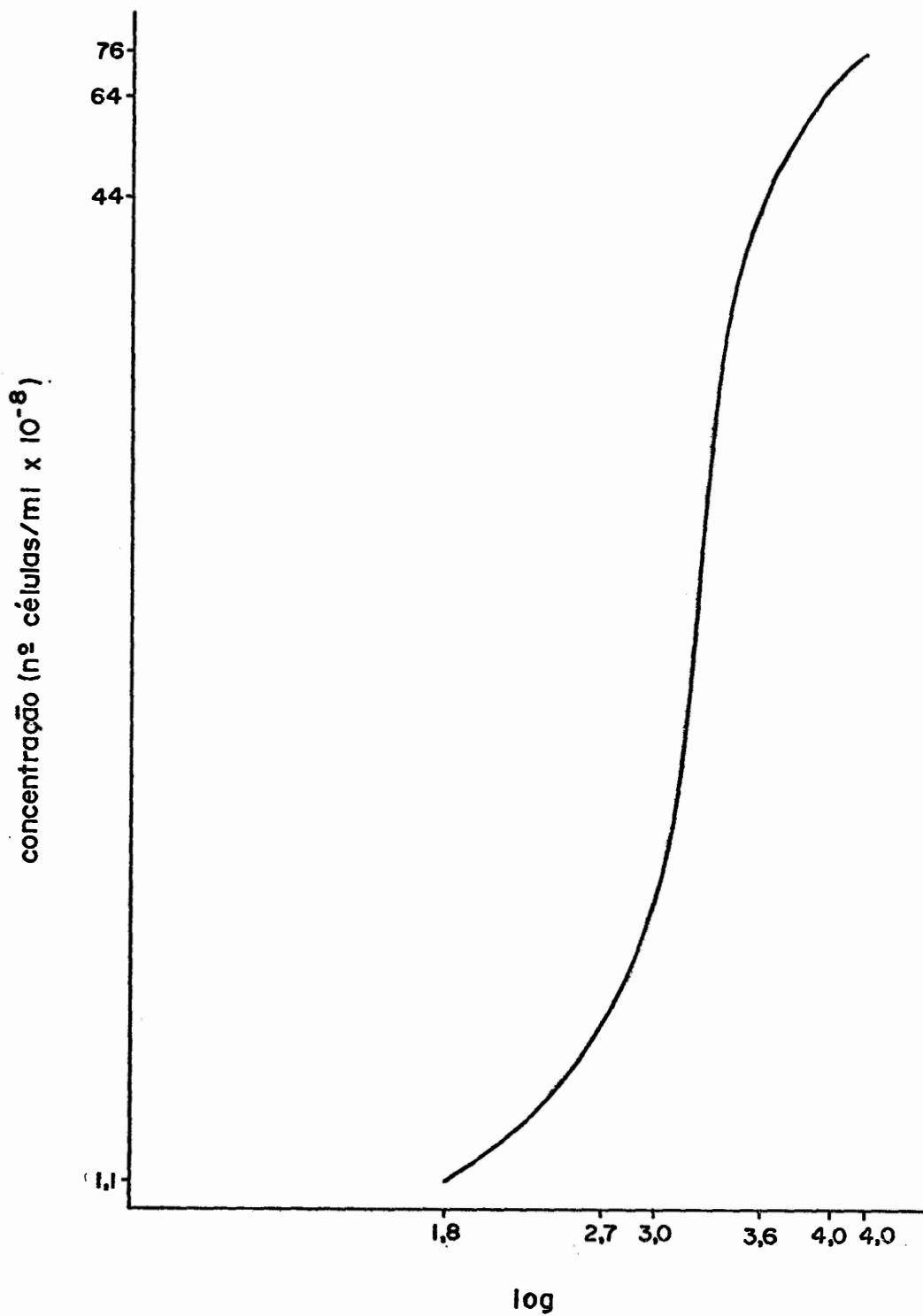


Figura 3. Curva de crescimento de *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 realizada pelo método colorimétrico.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE TRÊS CULTIVARES DE FEIJÃO, *Phaseolus vulgaris*, L.

Os extratos salinos obtidos dos cotilédones dos três cultivares estudados, Carioca, Negro Argel e Goiano precoce, mostraram alta capacidade eritroaglutinante (Tabela 2). Os três extratos aglutinaram fortemente eritrócitos humanos e os extratos das cultivares Goiano Precoce e Negro Argel também mostraram atividade alta quando testados com eritrócitos de vaca tratados com tripsina. Entretanto, o extrato do cultivar Carioca teve somente uma baixa atividade contra este último tipo de eritrócitos.

Análises eletroforéticas dos extratos revelaram a existência de diversos componentes protéicos em cada um dos três e estes componentes incluem proteínas com mobilidade semelhante, senão igual àquela lectina purificada comercialmente, PHA (Figura 4).

4.3. PURIFICAÇÃO DAS LECTINAS DE *Phaseolus vulgaris* CULTIVARES GOIANO PRECOCE, CARIOCA E NEGRO ARGEL.

As proteínas extraídas foram separadas em duas frações principais durante a realização da afinidade cromatográfica em coluna de Sepharose 4B-tiroglobulina. A curva

Tabela 2 - Eritroaglutinação dos extratos brutos de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.).

Extrato bruto	Título de Aglutinação	
	Sangue	
	Humano	Vaca
Goiano Precoce	4096	4096
Carioca	4096	32
Negro Argel	4096	1024
Controle: Salina	0	0

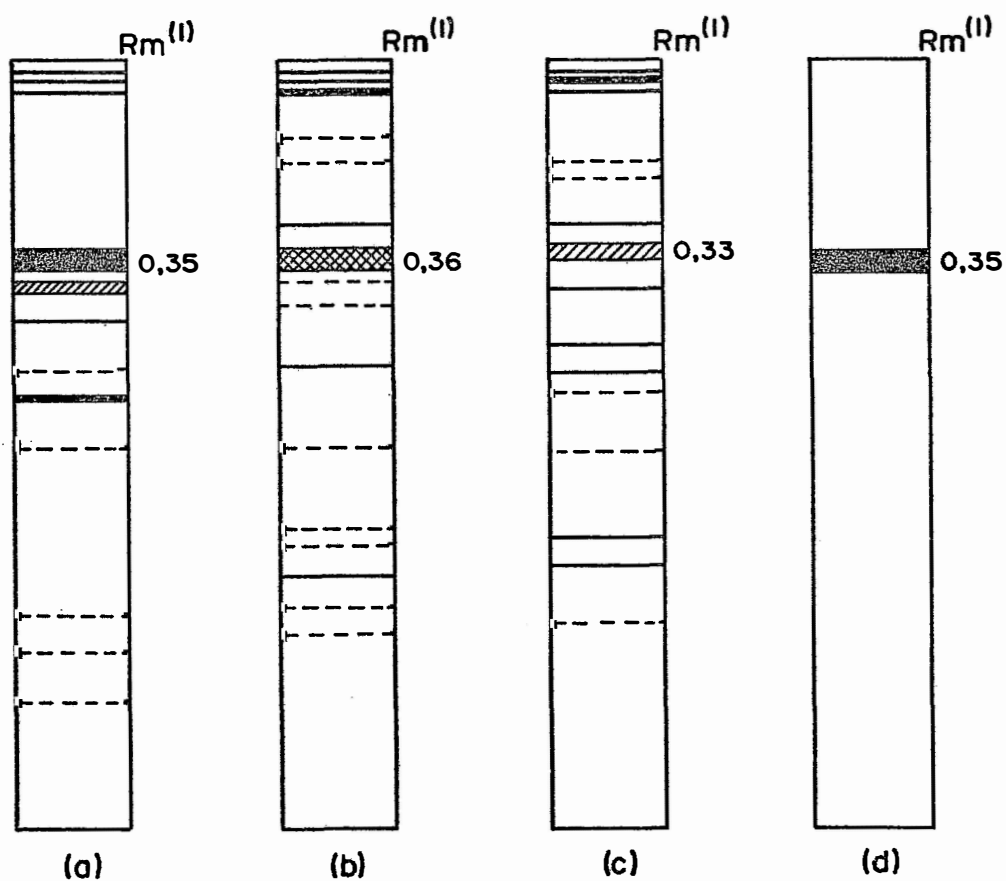


Figura 4 - Perfis protéicos dos extratos de três cultivares de *P. vulgaris* e uma lectina comercial (PHA) obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições âcidas.

descrita durante a eluição é mostrada na Figura 5. A maior parte da proteína passou pela coluna durante a passagem de tampão fosfato à pH 7,0, isto é, foi eluída e em subsequentes testes, esta proteína não exibiu atividade eritroaglutinante. Uma pequena parte da proteína aplicada à coluna foi adsorvida, quando tampão fosfato pH 7,0 foi utilizado. Esta proteína adsorvida somente foi eluída durante a passagem de tampão glicina HCl pH 3,0. Esta última fração de todos os três cultivares estudados, apresentou atividade eritroaglutinante contra sangue humano e dos cultivares Goiano Precoce e Negro Argel também aglutinaram eritrócitos de vaca tratados com tripsina (Tabela 3). Finalmente o perfil eletroforético sob condições ácidas permitiu caracterizá-las como lectinas (Figura 6).

A atividade eritroaglutinante alta das lectinas purificadas dos três cultivares quando testada com sangue humano e a diferenciação do cultivar Carioca em relação aos cultivares Goiano Precoce e Negro Argel, preservaram a especificidade observada quando extratos brutos foram utilizados porém a atividade hemaglutinante foi superior para as lectinas purificadas (Tabela 4).

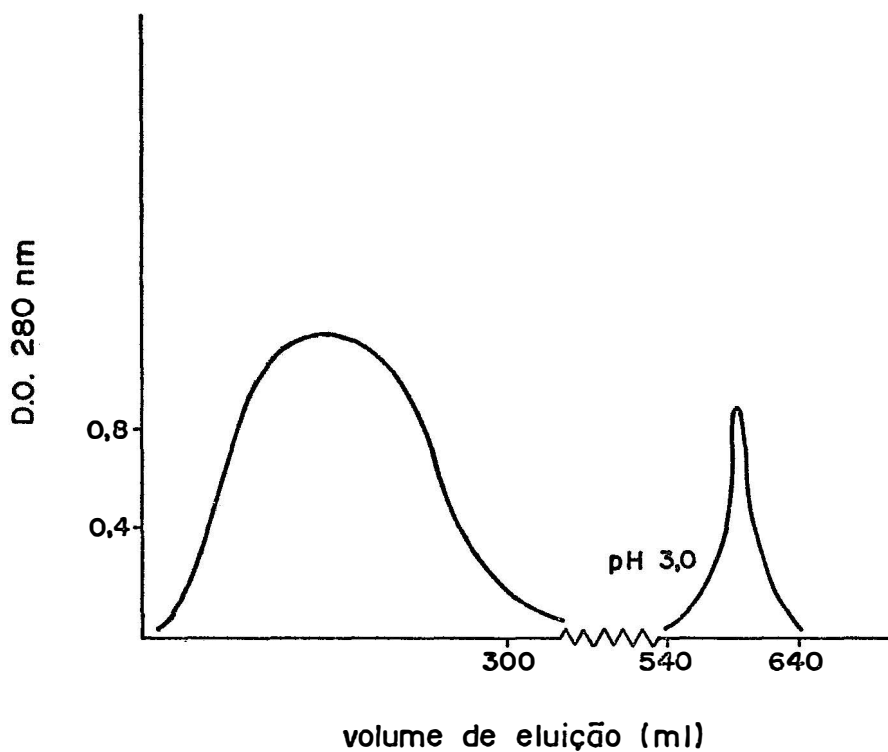


Figura 5 - Perfil de eluição obtido por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-tiroglobulina de um extrato protéico de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Negro Argel).

Tabela 3 - Aglutinação do material cromatográfico de 3 cultivares de feijoeiro contra sangue humano.

Cultivar	Título de Aglutinação		
	Fração pH7	Fração pH3	EB ¹
Carioca	0	4096	1024
G. Precoce	0	8192	2048
N. Argel	0	4096	1024

1 - Extrato bruto

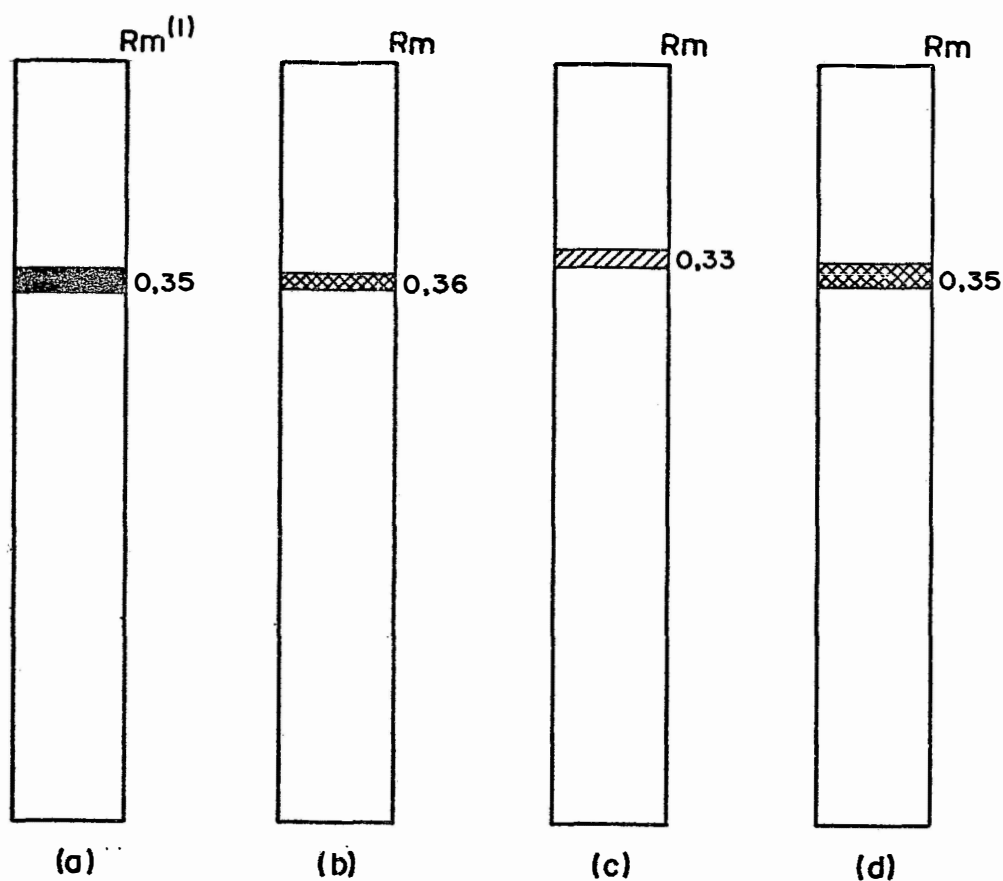


Figura 6 - Perfis protéicos das lectinas purificadas em cromatografia de afinidade de três cultivares de *Phaseolus vulgaris* e de uma lectina comercial (PHA), obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições ácidas.

(a) Negro Argel

(b) Goiano Precoce

(c) Carioca

(d) PHA-P L.1800

(1) Mobilidade Relativa

Tabela 4 - Eritroaglutinação dos EBs e lectinas purificadas de 3 cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.).

Amostras	Título de Hemaglutinação	
	SHG ¹	SVTTG ²
EB Goiano precoce	256	256
EB Carioca	256	8
EB Negro Argel	256	128
Lect. Goiano precoce	512	256
Lect. Carioca	1024	512
Lect.. Negro Argel	512	64

SHG¹: Sangue humano 4% conservado em glutaraldeído.

SVTTG²: Sangue de vaca 4% tratado com tripsina e conservado com glutaraldeído.

4.4. DETECÇÃO DA LIGAÇÃO LECTINA-*Rhizobium* ATRAVÉS DE TESTES DE AGLUTINAÇÃO

Enfatizando os resultados de HAMBLIN e KENT, (1973) verificou-se que quando células de *R. phaseoli* estirpes CIAT 1899 e C-05 foram crescidas em meio líquido de cultura por cinco dias, incubadas com extratos brutos de feijão cultivares Carioca, Goiano Precoce e Negro Argel ou PHA, posteriormente lavadas e finalmente misturadas com uma suspensão de eritrócitos humanos 4%, elas foram combinadas por cada uma das preparações (Tabela 5). Os títulos de aglutinação observados não foram idênticos e podem refletir uma afinidade preferencial entre *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 e a lectina de *P. vulgaris* cultivar Negro Argel e entre a estirpe C-05 e a lectina dos demais cultivares estudados, a saber Carioca e Goiano Precoce. Entretanto, as diferenças observadas foram estreitas e próximas dos limites de sensibilidade dos testes de aglutinação.

A avaliação direta da aglutinação bacteriana por lectinas e extratos de feijão pelo método de aglutinação em lâminas para microscópio também mostrou que a aglutinação foi visível no extrato bruto, na lectina purificada e na lectina comercial, confirmando os resultados obtidos anteriormente. Porém a aglutinação através da observação das placas de microdiluição não revelou células aglutinadas em qualquer

Tabela 5 - Eritroaglutinação de *R. phaseoli* incubado com o extrato protéico de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Sangue utilizado: humano 4% tratado com glutaraldeído.

Amostras	Título de Eritroaglutinação		
	N. Argel	G. Precoce	Carioca
células			
<i>R. phaseoli</i> CIAT-1899	08	02	02
<i>R. phaseoli</i> C-05	02	08	16
Sobrenadantes			
3ª Lavagem CIAT 1899	00	00	00
C - 05	00	00	00
4ª Lavagem CIAT-1899	00	00	00
C - 05	00	00	00

amostra e nenhuma diferença visível entre o controle e as amostras foi detectada.

4.5. CONDIÇÕES QUE PODEM AFETAR A AGLUTINAÇÃO

Para determinação da época de desenvolvimento de receptores lectínicos em *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 foram feitas análises através de aglutinação em lâminas para microscópio. A aglutinação foi avaliada após incubação das amostras com as células bacterianas e só foi detectada durante a fase log (Tabela 6). Uma possível explicação para este fato foi o baixo número de células/ml utilizado para zero e vinte e quatro horas de desenvolvimento da cultura. Para sanar o problema foi testada a aglutinação durante as primeiras vinte e quatro horas de desenvolvimento bacteriano usando uma mesma concentração de células, 10^9 células/ml. O nível da atividade aglutinante variou entre as diversas preparações protéicas, melhorando sensivelmente no período inicial de desenvolvimento quando comparado com os resultados obtidos anteriormente (Tabela 7).

A aglutinação das células bacterianas também foi dependente da relação entre a concentração de lectinas e o número de células bacterianas. Porém a aglutinação não foi detectada quando mais que 100 ng de PHA/ 10^6 células foram uti

Tabela 6 - Aglutinação de *R. phaseoli*, CIAT 1899 pelo método direto de aglutinação em lâmina para microscópio. (+ aglutinação positiva; - aglutinação negativa).

	Tempo em cultura líquida (hs)					
	0	24	30	36	48	60
EB Goiano	-	+++	+++	+++	+++	+++
Lectina purificada.	-	-	-	-	++	++
PHA-P L.1800	-	-	+++	+++	+++	+++
Controle	-	-	-	-	-	-

Tabela 7 - Aglutinação de *R. phaseoli* CIAT 1899 em diferentes fases de desenvolvimento (+ aglutinação positiva; - aglutinação negativa).

Amostras	Tempo de cultura (hs)			
	0	6	15	24
EB. Goiano Precoce	++	+++	++	+++
Lect. purif. Goiano Precoce	+	++	+++	++
PHA-P L.1800	-	++	+	++
Controle	-	-	-	-

lizados. Já a concentração protéica limitante quando extrato bruto foi utilizado foi de aproximadamente 10 vezes àquela de PHA (Tabela 8).

Os testes de eritroaglutinação com os sobrenadantes das incubações de *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 com lectinas de feijão cultivar Negro Argel, realizados em diferentes pHs, revelaram que existe atividade eritroaglutinante nas primeiras lavagens do material incubado. Esta atividade porém é inexistente após três ou quatro lavagens (Tabela 9). Quando os precipitados das incubações, cujas sobrenadantes não mais apresentavam atividade aglutinante detectável foram submetidos a testes de eritroaglutinação eles mostraram atividade, cuja intensidade foi mais elevada naquelas incubações em que o pH era mais baixo quando comparadas com as incubações realizadas em valores de pHs mais altos (Tabela 10). Os resultados obtidos nas análises com microscópio foram semelhantes aqueles acima descritos (Tabela 11). Os controles foram negativos para todas as incubações.

4.6. UTILIZAÇÃO DE LECTINAS MARCADAS

A atividade radioativa inicial da farinha de sementes de feijão cultivar Carioca, cultivadas em atmosfera contendo $^{14}\text{CO}_2$, era de 32000 cpm. Desta farinha obteve-se um

Tabela 8 - Aglutinação de diferentes concentrações de *R. phaseoli*, CIAT 1899 por diferentes concentrações de PHA ou extrato protéico de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). (+ aglutinação positiva; aglutinação negativa).

nº c/ml (x 10 ⁻⁹)	ng proteína/10 ⁶ células											
	C ¹		PHA						EXTRATO			
	0	10	20	40	80	160	320	640	1250	2500	5000	10000
0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,6	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3,2	-	-	++	+	+	-	+	+	+	-	-	-
6,4	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-

¹ Controle: salina

Tabela 9 - Aglutinação de eritrócitos humanos pelos sobrenadantes das incubações *R. phaseoli* CIAT 1899 - lectina de *P. vulgaris* cultivar Negro Argel em diferentes pHs.

	Título de aglutinação				
	1º SB ²	1º LV ³	2º LV ³	3º LV ³	4º LV ³
pH3 + lectina	16	00	04	00	00
pH3 + salina ¹	00	00	00	00	00
pH4,5 + lectina	16	00	02	00	00
pH4,5 + salina ¹	00	00	00	00	00
pH6,5 + lectina	00	00	00	00	00
pH6,5 + salina ¹	00	00	00	00	00
pH8 + lectina	00	00	00	00	00
pH8 + salina ¹	00	00	00	00	00

1 - controle

2 - sobrenadante da incubação inicial

3 - sobrenadante das lavagens

Tabela 10 - Aglutinação de eritrócitos humanos pelos precipitados das incubações de *R. phaseoli* CIAT 1899 com lectina de feijão cultivar Negro Argel em diferentes pHs.

Amostras	Título de aglutinação
pH3 + lectina	4096
pH3 + salina	00
pH4,5 + lectina	64
pH4,5 + salina	00
pH6,5 + lectina	02
pH6,5 + salina	00
pH8 + lectina	02
pH8 + salina	00

Tabela 11 - Aglutinação dos precipitados das incubações de *R. phaseoli* CIAT 1899 com lectina de feijoeiro cultivar Negro Argel a nível microscópico.

Amostras	Aglutinação
pH3,0 + lectina	++++
pH3,0 + salina	-
pH4,5 + lectina	++
pH4,5 + salina	-
pH6,5 + lectina	+
pH6,5 + salina	-
pH8,0 + lectina	+
pH8,0 + salina	-

extrato bruto das proteínas as quais posteriormente foram purificadas no laboratório através de cromatografia de afinidade, resultando na obtenção de lectina purificada radiomarcada.

A proteína do extrato bem como a lectina dele purificada apresentaram atividade aglutinante quando testadas com eritrócitos humanos 4% tratados com glutaraldeído (Tabela 12). A observação com microscópio revelou que as incubações feitas com lectina purificada nas concentrações 60, 30 e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e células de *R. phaseoli* apresentaram atividade aglutinante positiva. As incubações cujas concentrações lectínicas foram 3,0; 1,0 e 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ não apresentaram aglutinação detectável (Tabela 13). Quando o material acima descrito foi analisado em cintilador líquido, diferenças significativas entre as amostras e em relação ao controle não foram observadas.

Tabela 12 - Eritroaglutinação de extrato protéico e lectina purificada de feijão, cultivar Carioca radiomarcados com ^{14}C .

Amostras	Título de Hemaglutinação
Extrato bruto (170 μg proteína/ml)	64
Lectina purificada (30 μg /ml)	4096
Controle (solução salina 0,8%)	0

Tabela 13 - Observação microscópica da aglutinação de *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 com lectina de feijão cultivar Carioca radiomarcada com ^{14}C .

Amostras	Aglutinação
Lectina 60 $\mu\text{g/ml}$	++
Lectina 30 $\mu\text{g/ml}$	++
Lectina 10 $\mu\text{g/ml}$	+
Lectina 3,0 $\mu\text{g/ml}$	-
Lectina 1,0 $\mu\text{g/ml}$	-
Lectina 0,5 $\mu\text{g/ml}$	-

5. DISCUSSÃO

Após a descoberta das lectinas por Stillmark, em 1888 (citado em SHARON & LIS, 1987), as pesquisas a elas direcionadas têm se desenvolvido bastante. A seletividade das lectinas quando testadas com eritrócitos de diferentes animais (TOMS & WESTERN, 1971) e até mesmo sua especificidade para os diferentes grupos sanguíneos (RENKONEN, 1948; BOYD & REGUERA, 1949; ALLEN & BRILLIANTINE, 1969 e JAFFÉ et alii, 1972) elevou ainda mais o interesse à pesquisa das lectinas. Com esta intensificação foi possível detectar que as lectinas se ligam às células através de carboidratos presentes na superfície celular e então utilizadas em sistemas com estruturas polissacarídicas como papel determinante. Logo em seguida as lectinas foram detectadas em pelos absorventes e primórdios radiculares de *Phaseolus vulgaris* (HAMBLIN & KENT, 1973) no meio de germinação de sementes de soja (FOUNTAIN et alii, 1977; HWANG et alii, 1978 e CAUSSE & ROUGE, 1983) e finalmente em exudados radiculares do trêvo (DAZZO & HRABAK, 1981). Uma das muitas propriedades das lectinas é a de que elas, quando presentes em raízes jovens de feijão possuem potencial para se ligarem às bactérias (HAMBLIN & KENT, 1973). Este fato provocou muitas discussões e tem trazido muita confusão a

Stillmark, H.. Über rizin, ein giftiges ferment aus dem samen vom ricinus communis, L. und einigen Euphosbiaceen, 1888.

respeito deste propósito das lectinas. Para o presente trabalho vários métodos foram utilizados com a finalidade de esclarecer e expandir as discussões acima descritas e os resultados obtidos deveriam ser compatíveis ou pelo menos similares com aqueles já relatados.

Para que as lectinas fossem melhor investigadas era preciso o isolamento e purificação das mesmas. O método mais recomendado para a purificação das lectinas é o da cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-CNBr, hoje bastante desenvolvido (para referências ver PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1979). Por este método obtêm-se dois picos de separação, um deles desprovido de lectina e o outro constituído somente de lectina. Os dados obtidos neste trabalho foram semelhantes a estes. Obteve-se um primeiro pico eluído com tampão a pH 7,0 onde estava concentrada a maior parte da proteína não adsorvida, sem atividade aglutinante e portanto desprovida de lectina. Posteriormente, outro pico, uma pequena quantidade de proteína, porém alta capacidade para aglutinar eritrócitos, tida como lectina purificada.

Para avaliação das atividades eritroaglutinantes, foram utilizados equipamentos de microdiluição e micropipetagem da Cooke Eng. Company. Estes equipamentos requerem uma técnica de diluição serial provocando eventualmente erros de diluições. Devido a este fato, a diferença entre os títulos de aglutinação não são consideradas significativas quan-

do é de apenas uma diluição. Pequenas diferenças eritrocitárias entre indivíduos da mesma espécie também são tidas como dificuldades de método (JAFFÉ et alii, 1974). Para sanar o problema recomenda-se o uso de um mesmo indivíduo durante o decorrer de todo o experimento. No trabalho aqui desenvolvido foi utilizado o mesmo indivíduo humano e o mesmo animal quando sangue de vaca foi utilizado.

Um grupo de pesquisadores empregando o equipamento acima descrito classificou as lectinas de cultivares de feijão em quatro grupos distintos devido as variações significativas de suas capacidades aglutinantes (JAFFÉ et alii, 1972):

- . grupo A: aglutina eritrócitos humano, de coelho e de vaca tratado .
- . grupo B: aglutina eritrócitos humano e de coelho,
- . grupo C: aglutina eritrócitos de vaca tratado.
- . grupo D: inativo contra estes tipos de eritrócitos.

No presente trabalho, foi obtida uma eritroaglutinação bastante forte contra sangue humano e de vaca tratado

com tripsina (VTT) pelos extratos brutos dos cultivares Goiano Precoce e Negro Argel, indicando que estes extratos contêm proteína aglutinante, ou lectina do tipo A segundo a classificação de JAFFÉ (JAFFÉ et alii, 1972). Já o cultivar Carioca apresentou eritroaglutinação bastante forte quando testada com sangue humano porém está foi quase ausente quando sangue de vaca tratado com tripsina foi utilizado. É muito provável que este cultivar seja do tipo B. O cultivar Carioca foi também considerado do tipo B no trabalho do grupo de BROWN (BROWN et alii, 1982).

Um dos primeiros métodos com boa resolução em géis de poliacrilamida para separação de proteínas sob condições ácidas foi descrito por REISFELD et alii (1962). Apesar de ser um método que apresenta alguns inconvenientes para a separação de proteínas de sementes, ele é um método que fornece rapidez para a separação e visualização das cinco isolectinas de feijão (MILLER et alii, 1973). Através deste método vários pesquisadores relataram diferenças isolectínicas dentro da espécie (CARVALHO, 1981 e FELSTED et alii, 1981).

Os dados eletroforéticos obtidos no presente trabalho das lectinas dos cultivares Goiano Precoce e Carioca diferem entre si. Estes resultados concordam com dados já relatados (CARVALHO & DERBYSHIRE, 1985). A composição isolectínica aparente do cultivar Negro Argel também foi relatada e inclui cinco isolectinas segundo CARVALHO & DERBYSHIRE

(1985). Porém uma delas observada pelos autores citados não foi idêntica à isolectina correspondente a do cultivar Goiano Precoce, indicando uma diferença estrutural entre as duas lectinas. Possivelmente o grau de resolução obtido no presente trabalho foi inadequado para detectar esta diferença. Por outro lado esta foi a primeira vez que a lectina do cultivar Negro Argel foi isolada.

A interação lectina-bactéria foi sugerida por HAMBLIN & KENT (1973) como a base para a ligação do *Rhizobium* às raízes de leguminosas. Através de um método indireto de aglutinação do extrato de sementes de *Phaseolus vulgaris* eles concluíram que as raízes continham potencial de se ligarem às bactérias. No trabalho descrito, células de *R. phaseoli* estirpes CIAT 1899 e C-05 incubadas com extratos brutos obtidos de farinha cotiledonar das cultivares Goiano Precoce, Negro Argel e Carioca aglutinaram eritrócitos humanos. Estes resultados concordam com aqueles relatados por HAMBLIN & KENT (1973) e também foram interpretados como uma indicação de que as lectinas ligam-se às células bacterianas. A atividade aglutinante dos extratos brutos permite sugerir ainda que a presença de outros materiais extraídos das sementes não bloqueia ou inibe a ligação do *Rhizobium* à lectina.

O reconhecimento específico do hospedeiro na simbiose tem sido muito discutido. Evidências de especificidade já foram detectadas para muitas espécies de plantas como

soja (BOHLOOL e SCHMIDT, 1974; WOLPERT e ALBERSHEIM, 1976), trevo branco (DAZZO e BRILL, 1977; DAZZO et alii, 1978; DAZZO e BRILL, 1979) alfafa (DAZZO e BRILL, 1977). As evidências indicam que a especificidade pode se dar pelas diferenças entre a lectina da espécie da planta hospedeira e/ou a superfície bacteriana.

A correlação existente entre lectinas de sementes e lectinas de raízes tem sido estudada. Verificou-se que em sanfeno,^a lectina da semente é idêntica a lectina da raiz (HAPNER e ROBINS, 1979). Existe uma similaridade bastante grande entre a lectina da semente e a da raiz de ervilha (GATEHOUSE e BOULTER, 1980) e esta similaridade também se faz presente em soja (GADE et alii, 1981).

No presente trabalho, apenas a lectina de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), foram utilizadas devido a dificuldade experimental de se isolar lectinas de raízes. Como diferenças lectínicas tem sido observadas entre as cultivares de feijão (CARVALHO, 1981; ROMANI, 1983 e CARVALHO & DERBYSHIRE, 1985) neste trabalho dirigiu-se a atenção para verificação da especificidade entre os cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). Os dados aglutinantes não demonstraram especificidade absoluta entre os cultivares de feijão, porém testes indiretos de aglutinação sugerem que a afinidade da ligação pode variar entre diferentes combinações de estirpes e cultivares. Entretanto métodos mais sensíveis são ne-

cessários para examinar mais detalhadamente esta possibilidade.

O método atualmente mais utilizado para avaliar a aglutinação bacteriana é aquele da marcação com fluoresceína (DAZZO e BRILL, 1977; LAW e STRIJDOM, 1977); BHUVANESWARI et alii, 1977; BOHLOOL e SCHMIDT, 1974). Esta metodologia requer purificação e marcação da lectina necessitando para tal equipamentos e materiais sofisticados, tornando-se uma metodologia de alto custo. O método de aglutinação direta em lâminas para microscópio empregado no presente trabalho parece ser um método eficiente e de baixo custo podendo facilmente ser realizado. O método direto em placas de microdiluição apesar de simples não deve ser recomendado para se detectar aglutinação bacteriana, devido a sua baixa sensibilidade.

Muitos pesquisadores (BHUVANESWARI et alii, 1977; MORT e BAUER, 1980; TRUCHET et alii, 1983; CHAHAL e VILKHU, 1986; TSIEN e SCHMIDT, 1980) têm estudado a influência da idade da cultura na ligação do *Rhizobium* às lectinas. Os resultados obtidos ampliam aqueles relatados para soja e ervilha pelos pesquisadores acima citados, mostrando que células com receptores funcionais estiveram presentes em todas as épocas da cultura, inclusive no inóculo inicial, existindo porém uma fase ótima para a ligação. O nível de aglutinação de células de *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 por lectina de fei-

jão (*Phaseolus vulgaris*, L.), variou entre as diversas preparações protéicas sendo em geral baixo no início do experimento aumentando durante o desenvolvimento da cultura. No presente trabalho verificou-se também que a aglutinação é dependente da relação entre a concentração de lectinas e número de células bacterianas.

As atividades aglutinantes dos sobrenadantes e precipitado em pHs ácidos (pH 3,0 e pH 4,5) realizadas "in vitro" mostraram que o tratamento ácido pode romper algumas ligações lectina-*Rhizobium* porém muitas delas podem permanecer inalteradas. Estes resultados sugerem que a ligação *Rhizobium*-lectina em *Phaseolus vulgaris* "in vitro" pode ser bem sucedida em pHs ácidos. Porém a acidez do solo é uma barreira para a ligação do *Rhizobium* à planta hospedeira uma vez que ela prejudica outras etapas como sobrevivência e crescimento do *Rhizobium* no solo, formação do nódulo, eficiência simbiótica e nutrição da planta hospedeira.

6. CONCLUSOES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

. Lectinas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivares Negro Argel, Goiano Precoce e Carioca podem ligar-se a células de *R. phaseoli* estirpes C-05 e CIAT 1899. O desenvolvimento de receptores lectínicos de *R. phaseoli* estirpes C-05 e CIAT 1899 é dependente da fase de desenvolvimento da cultura e da relação entre a concentração de lectinas e o número de células bacterianas. O pH da incubação não impede, "in vitro", a ligação do *R. phaseoli* estirpes C-05 e CIAT 1899 a lectinas de feijoeiro *P. vulgaris*, cultivares Goiano Precoce, Negro Argel e Carioca.

. *R. phaseoli* estirpe CIAT 1899 apresenta uma maior afinidade para a lectina do cultivar Negro Argel e a estirpe C-05 uma afinidade maior para as lectinas dos cultivares Goiano Precoce e Carioca, indicando que provavelmente existem afinidades preferenciais entre os cultivares e as estirpes utilizadas sendo estas diferenças quantitativas e não qualitativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of Concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. Biochem. Biophys Acta, 147: 262-271, 1967.
- ALLEN, O.N. e BALDWIN, I.L. *Rhizobium* legume relationships. Soil Science, 78: 415-427, 1954.
- ALLEN, N.K. e BRILLIANTINE, L. A survey of hemagglutinin in various seeds. J. Immunol., 102: 1295-1298, 1969.
- ALLEN, A.K.; NEUBERG, A.; SHARON, N. The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. Biochem. J., 131: 155-162. 1973.
- ANDREWS, A.T. Navy (haricot) - bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. Biochem. J., 139: 421-429, 1974.
- ANÓLES, G.C.; LAGARES, A.; WALL, L.G.; FAVELUKES, G. Adhesion específica de *Rhizobium meliloti* a la superficie radicular de alfafa. Anais XII Reunião Latino-Americana sobre *Rhizobium*, 21-26 out. -Campinas, São Paulo, Brasil, 1984.

- BHUVANESWARI, T.V. e BAUER, W.D. Role of lectins in Plant-Microorganism Interactions. III. Influence of rhizosphere/rhizoplane culture conditions on the soybean lectin-binding properties of rhizobia. Plant Physiol., 62: 71-74, 1978.
- BHUVANESWARI, T.V.; PUEPPKE, S.G.; BAUER, W.D. Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to Rhizobia. Plant Physiol., 60: 486-491, 1977.
- BIRD, G.W.G. Haemagglutinins in seeds. Brit. Med. Bull., 15: 165-168, 1959.
- BOHLOOL, B.B. e SCHMIDT, E.L. Lectins: A possible basis for specificity in the *Rhizobium* legume root nodule symbiosis. Science, 185: 269-271, 1974.
- BOWLES, D.J. e KAUSS, H. Carbohydrate-binding proteins from cellular membranes of plant tissue. Pl. Sci. Lett., 4: 411-418, 1975.
- BOYD, W.C. e REGUERA, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. J. Immunol., 62: 333-339, 1949.

- BOYD, W.C. e SHAPLEIGH E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science, 119: 419, 1954.
- BROWN, J.W.S.; OSBORN, T.C.; BLISS, F.A.; HALL, T.C. Bean lectins. Part 1 - Relationships between agglutinating activity and electrophoretic variation in the lectin containing G₂/albumin seed protein of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet., 62: 263-271, 1982.
- CALLAHAM, D.A. e TORREY, J.G. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Can J. Bot., 59(9): 1647-1664, 1981.
- CALLOW, J.A. Recognition, resistance and the role of plant lectins in host parasit interactions. Adv. Bot. Res., 4: 2-47, 1977.
- CARVALHO, M.T.V. Investigações bioquímicas sobre hemaglutininas e outras proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). São Paulo, 144p. ilus. 30cm. [Tese de Doutorado-Depto Bioquim. do Inst. Quím. da USP], 1981.

CARVALHO, M.T.V. e DERBYSHIRE, E. Seed lectin variation in cultivars of beans. Phaseolus Inform. Exch., 1: 14-16, 1985.

CAUSSE, H e ROUGÉ, P. Lectin release from imbibed soybean seeds and its possible function. In: T.C. BOGTTANSENS e G.A. SPENGLER, eds. Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, 3: 559-572, de Gruyter, Berlin, 1983.

CAUSSE, H.; ROUGÉ, P.; SPILTHOOREN, J.P.; LABROUE, L. Preservation of soybean seedlectin by interaction with soil clay colloids. Soil Biol. Biochem., 17(4): 587-589, 1985.

CHAHAL, V.P.S. e VILKHU, K.S. Influence of age of *Rhizobium* culture of lectin bindings encapsulation and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). Acta Microbiologia Polonica, 35(1/2): 61-67, 1986.

CLARKE, A.E.; KNOT, R.B.; JERMYN, M.A. Localization of lectins in legumes cotyledons. J. Cell. Sci., 19: 157-167, 1975.

- DAHLGREEN, K.; PORATH, J.; LINDAHL-KIESSLING, K. On the purification of PHA from *Phaseolus vulgaris* seeds. Archs. Biochem. Biophys., 137: 306-314, 1970.
- DAZZO, F.B. e BRILL, W.J. Receptor site on clover and alfalfa roots for *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol., 33(1): 132-136, 1977.
- DAZZO, F.B. e BRILL, W.J. Bacterial pollyssacharide which binds *Rhizobium trifolii* to clover roots hairs. J. Bacteriol., 137(3): 1362-1373, 1979.
- DAZZO, F.B. e HRABAK, M.E. Presence of trifoliin A, a *Rhizobium* binding lectin in clover root exudate. Journal of Supramolecular Structures and Cell Biochemistry, 16: 133-139, 1981.
- DAZZO, F.B. e HUBBELL, D.H. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. Appl. Microbiol., 30: 1017-1033, 1975.
- DAZZO, F.B.; NAPOLI, C.A.; HUBRELL; D.H. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 32: 166-171, 1976.

DAZZO, F.B.; YANKE, W.E.; BRILL, W.J. Trifoliin: A *Rhizobium* recognition protein from white clover. Bioch. Biophys. Acta, 539: 276-286, 1978.

DAZZO; F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABÁK, E.M.; ABE, M.; PANKRATZ, S.H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 48(6): 1140-1150, 1984.

ENTLICHER, G.; KOSTIR, J.V.; KOCOUREK, J. Studies on phyto-hemagglutinins. III, Isolation and characterization of hemagglutinins from the pea (*Pisum sativa* L.). Biochem. Biophys. Acta, 221: 272-281, 1970.

ESTRADA-GARCIA, M.T.; REYNA-TÉLLEZ, S.; CASTAÑEDA, M.T. Possible utilización de las lectinas para la identificación de cepas infectivas de *Rhizobium*, empleando la prueba de agglutinación bacteriana. Rev. Lat. Am. Microb., 26: 273-275, 1984.

FELSTED, R.L. LI, J.; POKRYWRA, G.; EGORIN, M.J.; SPIEGEL, I.; DALE, R.M.K. Comparison of *Phaseolus vulgaris* cultivars on the basis of isolectins differences. Int. J. Biochem., 13 (5): 549-557, 1981.

FOUNTAIN, D.W.; FOARD, D.E.; REPLOGUE, W.D.; YANG, W.K. Lectin release by soybean seeds. Science, 197: 1185-1187, 1977.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MeCOY, E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison: University of Wisconsin Press. p. 343, 1932.

GADE, W.; JACK, M.A.; DAHL, J.B.; SCHMIDT, E.L.; WOLDT, F.. The isolation and characterization of a root lectin from soybean. J. Biol. Chem., 256: 12905-12910, 1981.

GATEHOUSE, J.A. e BOULTER D. Isolation and properties of a lectin from the roots of *Pisum sativum*. Physiol. Plant., 49: 437-442, 1980.

GOLDSTEIN, I.J. e HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 35: 127-340, 1978.

GRESSHOFF, P.M.; CARROL, B.; MOHAPATRA, S.S.; REPORTER, M.; SHINE, J.; ROLFE, B.G. Host factor control of nitrogenase function. In: A.H. GIBSON e W.E. NEWTON, eds. Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Australian Academy of Science, Canberra City, p. 209-21, 1981.

- HAGUE, D.R. Studies of storage proteins of higher plants. I. Con A from three species of the genus *Canavalia*. Plant Physiol., 55: 636-642, 1975.
- HALVERSON, L.J. e STACEY, G.. Host recognition in the *Rhizobium* soybean symbiosis. Evidence for the involvement of lectin in nodulation. Plant Physiol., 77: 621-625, 1985.
- HAMBLIN, J. e KENT, S.P.. Possible role of phytohaemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. Nature, New Biology, 245(140): 28-30, 1973.
- HAPNER, K.D. e ROBBINS, J.E. Isolation and properties of a lectin from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Bioch Biophys. Acta, 580: 186-197, 1979.
- HOWARD, I.K.; SAGE, H.J.; HORTON, C.B.. Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. Archs. Biochem. Biophys., 149: 323-326, 1972.
- HUBBELL, D.H. Studies on the root hair "curling factor" of *Rhizobium*. Bot. Gaz., 131(4): 337-342, 1970.

- HWANG, D.L.; YANK, W.K.; FOARD, D.E.; LIN, K.T.D. Rapid release of protease inhibitors from soybeans. Immunochemical quantitation and parallels with lectins. Plant Physiol., 61: 30-34, 1978.
- JAFFÉ, W.G. Hamagglutinins. In: LIENER, I.E., ed. Toxic constituents of plant foodstuffs. Acad. Press., N.Y. e London, p. 69-101, 1969.
- JAFFÉ, W.G.. Hemagglutinins (lectins). In: LIENER, I.E., ed. Toxic constituents of plant foodstuffs. Acad. Press. N.Y. e London, p. 73-102, 1980.
- JAFFÉ, W.G. e GAEDE, K.. Purification of a toxic phytohaemagglutinin from black bean (*Phaseolus vulgaris*). Nature, 183: 1329-1330, 1959.
- JAFFÉ, W.G. e HARMING, K. Fractionation of proteins from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). Archs. Biochem. Biophys., 109: 80-91, 1965.
- JAFFÉ, W.G. e VEGALETTE, C.L.. Heat labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Nutrition, 94: 203-210, 1968.

- JAFFÉ, W.G.; BRUCHER, O.; PALOZZO, A.. Detection of four types of phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). Z. Immun. Allerg. Klin. Immunol., 142(2): 439-447, 1972.
- JAFFÉ, W.G.; LEVY, A.; GONZALES, D.I.. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. 2685-2693, 1974.
- JANSEN, D.H.; JUSTER, H.B.; LIENER, I.E. Insecticidal action of phytohemagglutinin in black beans on a bruched beetle. Science, 192: 795-796, 1976.
- JAYME-WILLIAMS, D.J. The significance of the intestinal microflora in relations to the oral toxicity of raw navy beans and jack beans for japanese quail. In: NORTON, G. ed., Plant Proteins, p. 141-152. Butterworths, London, Boston., 1978.
- JONES, J.B.; D.J. FLANDERS, B.G. ROLFE. Association of *Rhizobium* strains with roots of *Trifolium repens*. Applied and Environ. Microbiol., 49(6): 1511-1520, 1985.
- JORDAN, D.C. e ALLEN, O.N. Gram negative aerobic rods and cocci. Family III. Rhizobiaceae. In: BUCHANAN, R.E. e GIBBONS, N.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th. ed. The William and Wilkins Co. Baltimore, 1974.

- KATO, G.; MARUYAMA, Y.; NAKAMURA, M.. Involvement of lectins in *Rhizobium*-pea recognition. Plant and Cell Physiol., 22 (5): 759-771, 1981.
- KAUSS, H. e GLASER, C. Carbohydrate-binding proteins from plant cell walls and their possible involvement in extension growth. FEBS Lett., 45: 304-307, 1974.
- KOCOUREK, J. e KOREJSI, V.. Defining a lectin. Nature, 290 (5803): 188, 1981.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227: 680-685, 1970.
- LAW, I.J. e B.W. STRIJDOM. Some observations on plant lectins and *Rhizobium* specificity. Soil Biol. Biochem., 9: 79-84, 1977.
- LAW, I.J. e STRIJDOM, B.W. *Lotononis bainesii* seed and root lectins and their interaction with *Rhizobium*. S. Afr. J. Sci., 78: 375, 1982.
- LAW, I.J. e STRIJDOM, B.W. Properties of lectins in the root and seed of *Lotononies bainesii*. Plant Physiol., 74: 773-778, 1984(a).

- LAW, I.J. e STRIJDOM, B.W. Role of lectins in the specific recognition of *Rhizobium* by *Lotononis bainesii*. Plant Physiol., 74: 779-785, 1984(b).
- LIENER, I.E. Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibitor of rat growth. J. Nutrition, 49: 527-531, 1953-
- LIENER, I.E. Seed hemagglutinins. Econ. Bot., 18: 27-33, 1964.
- LIENER, I.E.. The nutritional significance of the plant lectins. In: R.L. ORY, etc. Antinutrients and Natural Toxicants in Food. p.143-157, 1981.
- LIENER, I.E. e PALLANSCH, M.J. Purification of a toxic substance from deffated soybean flour. J. Biol. Chem., 197: 29-37, 1972.
- LINDELMANN, W.C.; SCHMIDT, E.L.; HAM, G.E. Evidence for double infection within soybean nodules. Soil Science, 118(4): 274-279, 1952.
- LIS, H. e SHARON, N. Lectins in higher plants. The Biochemistry of Plants, 6: 371-447, 1981.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDAL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Boil. Chem., 193: 265-275, 1951.

- MIALONER, G.; PRIVAT, J.P.; MONSIGNY, M.; KAHLEM, G.; DURAND, R.
Isolement, propriétés physico-chimiques et localisation
in vivo d'une phytohemagglutinine (lectine) du *Phaseolus*
vulgaris L. (var. rouge). Physiol. Vég., 11: 519-537, 1973
- MILLER, J.B.; NOYES, C.; HEINRIKSON, R.; KINGDON, H.S. YACHNIN,
S. Phytohemagglutinin mitogenic proteins. Structural
evidence for a family of isomitogenic proteins. J. Exp. Med.,
138: 939-951, 1973.
- MIRELMAN, D.; GALUN, E.; SHARON, N.; LOTAN, R. Inhibition of
fungal growth by WGA. Nature, 256 (5516): 414-416, 1975.
- MISHKING, M.; KEEGSTRA, K.; PALEVITZ, B.A. Distribution of
wheat germ agglutinin in young wheat plants. Plant Physiol.,
66: 950-955, 1980.
- MORT, A.J. e BAUER, W.D. Composition of the capsular and
extracellular polyssacharides of *Rhizobium japonicum*.
Changes with culture age and correlations with binding of
soybean seed lectins to the bacteria. Plant Physiol., 66
(11): 158-63, 1980.

NAPOLI, C.A. e HUBBEL, D.H. Ultrastructure of *Rhizobium* induced infection threads in clover root hairs. Appl. Microbiol., 30: 1003-1009, 1975.

NORRIS, D.O. Legumes and the *Rhizobium* symbiosis. Emp. J. Exper. Agric., 24(96): 247-270, 1956.

NUTMAN, P.S. The influence of physical environmental factors on the activity of *Rhizobium* in soil and in symbiosis. In: Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. A Technical report published by the International Atomic Energy Agency, Vienna, 1972-IAEA-149. p. 55-83, 1972.

OLSON, M.O.J. e LIENER, I.E. Some physical and chemical properties of Concanavalin A, the phytohemagglutinin, of the jackbean. Biochemistry, 6: 105-111, 1967.

PHARMACIA FINE CHEMICALS. Affinity chromatography. Principles & Methods. Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia, 1979.

PUSZTAI, A e WATT, W.B. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*: a comprehensive study of fractionation. Biochim. Biophys. Acta, 365: 57-71, 1974.

- PUSZTAI, A.; CROY, R.R.D.; GRANT, G.; WATT, W.B. Compartmentalization in the cotyledonary cells of *Phaseolus vulgaris* L. seeds: a differential sedimentation study. New Phytol., 79: 61-71, 1977.
- REISFELD, R.A.; LEWIS, U.J.; WILLIAMS, D.E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, 195: 281-283, 1962.
- RENKONEN, K.O.. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of family of leguminosae. Ann. Med. Exp. Fenn., 26: 66-72, 1948.
- RIGAS, D.A. e OSGOOD, E.E. Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. Biol. Chem., 212: 607-612, 1955.
- RUDIGER, H. On the physiological role of plant lectins. Bioscience, 34(2): 95-99, 1984.
- ROMANI, V.L.M.. Estudos bioquímicos sobre a variabilidade da composição protéica em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 101p. Ilus., 28cm. [Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo], 1983,

- SELA, B.A.; LIS, H.; SHARON, N.; SACHS, L. Isolectins from waxbean with differential agglutination of normal and transformed cells. Biochim. Biophys. Acta, 310: 273-277, 1973.
- SCHMIDT, E.L. Initiation of plant root-microbe interactions. Ann. Rev. Microbiol., 33: 355-376, 1979.
- SCOTT, F.M. Growth and structure of roots. Cap. 2. In: DOMMERGUES, Y.R.; KRUPA, S.V., eds. Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam-Oxford, New York, 1978.
- SHARON, N. e LIS, H. Reflections on biochemistry: A century of lectin research (1888-1988). TIBS, 12: 488-491, 1987.
- SHERWOOD, J.E.; G.L. TRUCHET; F.B. DAZZO. Effect of nitrate supply on the in vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii* - binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. Planta, 162: 540-547, 1984.
- STACEY, G.; PAAU, A.S.; BRILL, W.J. Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis. Plant Physiol., 66: 609-614, 1980.

- STEIN, M.D. e SAGE, H.J. Studies on a phytohaemagglutinin from the lentil. V. Binding of lens culinaris haemagglutinin to lymphocytes and erythrocytes. Archs. Biochem. Biophys., 150: 412-420, 1972.
- SUMMER, J.B. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformes*. J. Biol. Chem., 37: 137-141, 1919.
- SUMMER, J.B. e HOWELL, S.F.. The identification of hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. J. Bacteriol., 32: 227-237, 1936.
- TAKAHASHI, T.; RAMACHANDRA-MURTHY, P.; LIENER, I.E.. Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. Bioch. Biophys. Acta, 133: 123-133, 1967.
- TOMS, G.C. e A. WESTERN. Phytohemagglutinins. In: HARBOIN, J.B.; BOULTER, D.; TURNER, B.L., eds. Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, London and New York, p. 367-462, 1971.
- TRINICK, M.J. Symbiosis between *Rhizobium* and the nonlegume, *Trema aspera*. Nature, 244: 459, 1973.

- TRUCHET, G.L.; DAZZO, F.B.; VASSE, J., Agglutination of *Rhizobium japonicum* 3I 1b 110 by soybean lectin. Plant and Soil, 75: 265-268, 1983.
- TRUCHET, G.; MICHEL, M.; DENARIE, J.. Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically defective mutants of *Rhizobium meliloti*. Differentiation 16: 163-172, 1980
- TSIEN, H.C. e SCHMIDT, E.L.. Accumulation of Soybean lectin binding polyssacharide during growth of *Rhizobium japonicum* as determined by hemagglutination inhibition assay. Appl. Environ. Microbiol., 39(6): 1100-1104, 1980.
- URBAN, J.E. e DAZZO, F.B.. Succinate-induced morphology of *Rhizobium trifolii* 0403 resembles that of bacterioids in clover nodules. Appl. Environ. Microbiol., 44(1): 219-226, 1982.
- VERMA, D.P.; BALL, S.; GUERIN, C.; WASAMAKER, J. Leghemoglobin biosynthesis in soybean root nodules characterization of the nascent and released peptides and the relative rate of synthesis of the major leghemoglobins. Biochem., 18: 476-483, 1979.

VINCENT, J.M. Root nodule symbiosis with *Rhizobium*

In: QUISPEL, A., ed. The biology of nitrogen fixation.
North Holland Publ. Co., Amsterdam. p.265-341.

VINCENT, J.M., Manual práctico de Rhizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 320p. Argentina, 1975.

WAREMBOURG, F.R. e MORRAL, R.A.A. Energy flow in plant-microorganism system. In: Y.R. DOMMARGUES e S.V. KRUPA, eds. Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam e Oxford e New York, 1978.

WATKINS, W.M. e MORGAN, W. T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in cell serum by simple sugars, Nature, 169: 825-826, 1952.

WEBER, T.H.; CIRO, H., NORDMAN, C.T. Characterization of lymphocyte stimulating blood cell-agglutinating glycoproteins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Biochem. Biophys. Res. Commun., 70: 729-737, 1972.

- WOLPERT, J.S. e ALBERSHEIN, P. Host-Symbiont interactions
I. The lectins of legumes interact with the O₃-antigen -
containing lipopolysaccharides of their symbiont. Rhizobia
Biochem. Biophys. Res. Commun., 70: 729-737, 1976
- WONG, P.P. Interactions between Rhizobia and Lectins
of Lentil. Pea. Broad Bean and jackbean. Plant Physiol.,
65(6): 1049-52, 1980.
- YAO, P.Y. e VINCENT, J.M. Factors responsible for the
curling and branching of clover root hairs by *Rhizobium*.
Plant and Soil, 45: 1-16, 1976.