

COMPORTAMENTO DA LECTINA DE SEMENTES DE *CANAVALLIA BRASILIENSIS* MART. DURANTE A GERMINAÇÃO EM PRESENÇA DE LUZ

Benildo Sousa Cavada

Clébia Crisóstomo Vieira

Lia Magalhães de Almeida Silva

José Tadeu Abreu de Oliveira

Renato de Azevedo Moreira¹

RESUMO – A comparação da metabolização da lectina de *Canavalia brasiliensis* com as demais proteínas de reservas durante a germinação das sementes na presença de luz foi acompanhada através da combinação de dosagem de proteínas solúveis, determinação da atividade hemaglutinante, cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 e eletroforese em gel de poliácridamida em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol. Os resultados foram comparados com resultados anteriormente obtidos com sementes germinadas na ausência da luz e ficou evidenciado que, mesmo com as plântulas fotossintetizando, a lectina de *Canavalia brasiliensis* é preservada, sendo metabolizada após as demais proteínas de reserva. Estes dados sugerem também que estas proteínas devam ter funções específicas durante o ciclo vital da planta e não se constituem apenas em proteínas de reserva.

Palavras-chave: Lectinas, *Canavalia brasiliensis*, germinação.

ABSTRACT – *Canavalia brasiliensis* seed lectin during germination in the presence of light. The mobilization of the lectin of *Canavalia brasiliensis* during seed germination, in the presence of light, was studied in comparison with the reserve proteins. Methods employed were determination of soluble protein content, hemagglutinating activity, affinity chromatography on Sephadex G-50 column, and PAGE-SDS. The results showed that the lectin was metabolized later than the reserve proteins suggesting that it may have a special function other than a simple reserve protein.

Key words: Lectins, *Canavalia brasiliensis*, seed germination.

Introdução

As lectinas são proteínas de origem não imune, capazes de reconheci-

1 – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 1065 – CEP 60001 – Fortaleza (CE) Brasil.

mento específico e ligação reversível a compostos contendo carboidratos e de aglutinar células e glicoconjugados, sem induzir qualquer modificação química nos mesmos (Goldstein *et al.*, 1980; Kocourek e Horejsi, 1983; Barondes, 1988). Distribuídas amplamente na natureza e praticamente em todos os tipos de organismos vivos elas têm sido mais estudadas, entretanto, nos vegetais. O papel desempenhado pelas lectinas nos vegetais onde são encontradas é, ainda, desconhecido. Especula-se que elas poderiam agir como agentes mediadores da simbiose entre plantas e microorganismos (Hamblin e Kent, 1973; Bohloul e Schimdt, 1974; Dazzo e Truchet, 1983; Diaz *et al.*, 1989), proteger as plantas contra o ataque de patógenos (Mirelman *et al.*, 1975; Jansen *et al.*, 1976; Barkai-Golan *et al.*, 1978; Mishkind *et al.*, 1982; e ainda que seriam simples proteínas de reserva. Uma das maneiras de contribuir para a elucidação do papel endógeno das lectinas vegetais é acompanhá-las durante o ciclo vital da planta e compará-las com as demais proteínas de reserva das sementes. Em sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart., germinadas no escuro, a lectina e demais proteínas de reserva cotiledonárias foram acompanhadas ao longo da germinação, não só pela atividade hemaglutinante como por métodos físico-químicos e imunoquímicos, e foi mostrada uma metabolização diferenciada da lectina em relação às demais proteínas (Moreira e Cavada, 1984). O presente trabalho tem como objetivo acompanhar, através de diferentes métodos, a lectina de sementes de *C. brasiliensis* germinadas na presença de luz e confirmar ou não a sua metabolização diferenciada já observada quando da germinação no escuro, com o intuito de investigar uma provável influência da fotossíntese nesta metabolização.

Material e métodos

Sementes de *C. brasiliensis* foram coletadas no Estado do Ceará

Condições de germinação.

Após pré-tratamento com ácido sulfúrico concentrado para quebrar a dormência (Moreira e Cavada, 1984) as sementes foram colocadas para germinar em potes contendo vermiculite previamente esterilizada e úmida. As sementes foram imersas na vermiculite, e deixadas germinar na presença da luz, sem a adição de qualquer nutriente (apenas H₂O. destilada e esterilizada) em ambiente saturado de H₂O. A quantidade de água adicionada à vermiculite era o suficiente para não necessitar de regas posteriores. Cotilédones e eixos (plântulas sem os cotilédones) foram coletados a intervalos regulares (0, 3, 5, 7, 10, 13, 17 e 21 dias após o início da embebição). Amostras foram utilizadas para a determinação de peso fresco e peso seco (110°C, por 24 horas) e o restante do material coletado foi imediatamente liofilizado, moído e estocado a 4°C até uso posterior.

Extração de proteínas

Proteínas de farinhas de cotilédones e eixos embrionários coletados foram extraídas com NaCl 0,15M (1:10, p/v) durante 4 horas e temperatura ambiente, após o que as suspensões foram centrifugadas a 15.000 X g, a 4°C por 20 minutos, e os sobrenadantes utilizados para análises posteriores.

Dosagem de proteínas

A determinação de proteínas nos diversos extratos e frações foi feita segundo o método de Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. A absorbância a 280 nm foi também utilizada para dosar proteínas em eluatos cromatográficos.

Eletroforeses

Experimentos de eletroforese em gel de poliácridamida em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol foram desenvolvidos em placas segundo a técnica de Laemmli (1970).

Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante dos diferentes extratos e frações foi determinada como descrito anteriormente (Moreira e Perrone, 1977) utilizando-se soluções de hemácias de coelho a 2%. A atividade hemaglutinante específica foi expressa como unidade de hemaglutinação (U.H.).mg⁻¹. Uma U.H. foi estabelecida como a concentração de proteínas por ml no último tubo que apresentou hemaglutinação visível.

Cromatografia de afinidade

Os extratos de cotilédones com diferentes dias de germinação foram aplicados a uma coluna (1x30cm) de Sephadex G-50 equilibrada com NaCl 0,15M contendo Ca²⁺ 5mM e Mn²⁺ mM. A coluna foi inicialmente eluída com a solução de equilíbrio e em seguida com a mesma solução contendo glicose 0,1 M ou com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. As diferentes frações obtidas foram dialisadas contra água, liofilizadas e estocadas para uso posterior.

Resultados e discussão

As figuras 1, 2 e 3 apresentam os resultados obtidos para peso fresco, peso seco e proteínas solúveis e atividade hemaglutinante em cotilédones de *C. brasiliensis* coletados ao longo da germinação em presença da luz. Não foi detectada atividade hemaglutinante nos eixos. Estes dados confirmam aqueles

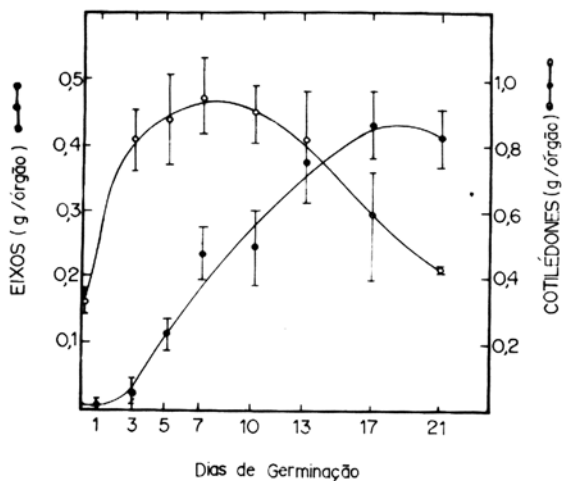


Figura 1 – Peso fresco de cotilédones (○-○) e de eixos (●-●) de *Canavalia brasiliensis* ao longo da germinação na presença de luz.

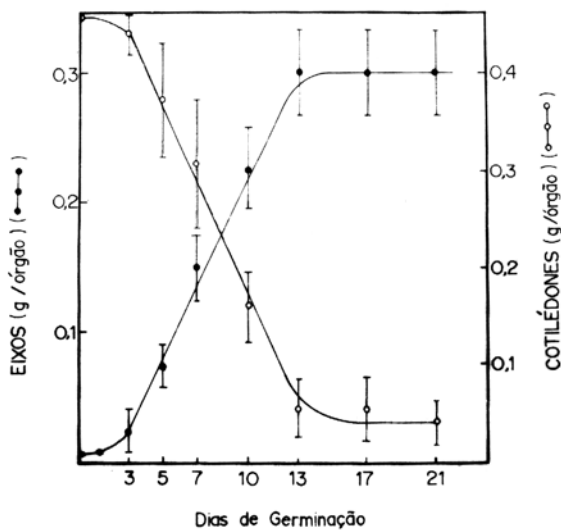


Figura 2 – Peso seco de cotilédones (○-○) e de eixos (●-●) de *Canavalia brasiliensis* ao longo da germinação na presença de luz.

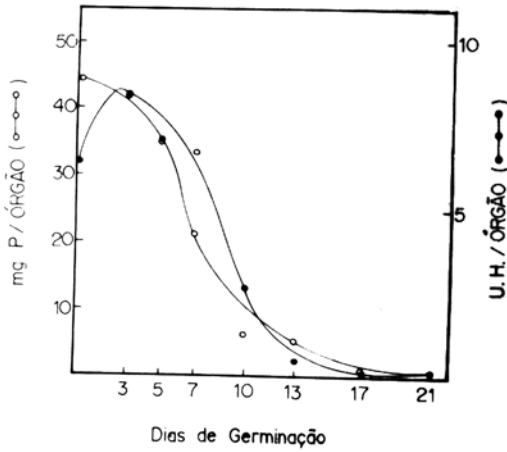


Figura 3 – Contendo proteico (○-○) e atividade hemaglutinante (●-●) de cotilédones de *Canavalia brasiliensis* ao longo da germinação na presença de luz.

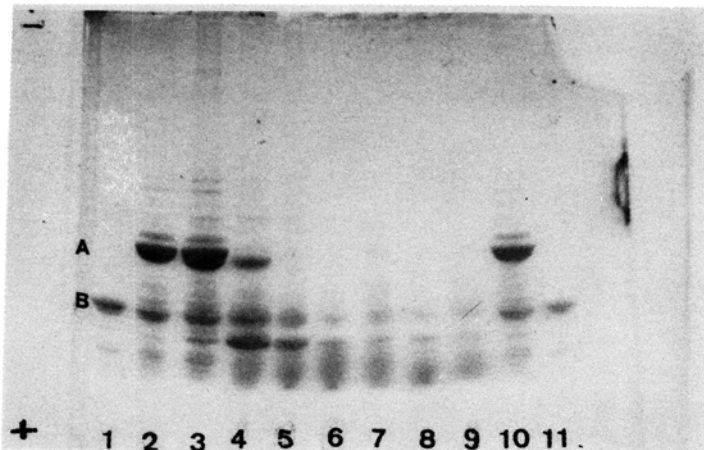


Figura 4 – Eletroforese em gel de poliácridamida em presença de SDS e betamercaptoetanol. Amostras: 1 e 9, Lectina de *Canavalia brasiliensis* (P_{II}); 2 a 8 proteínas extraídas de farinhas de cotilédones com 3, 5, 7, 10, 13, 17 e 21 dias de germinação na presença de luz. A: P_I; B: P_{III}, subunidade de 26 KD.

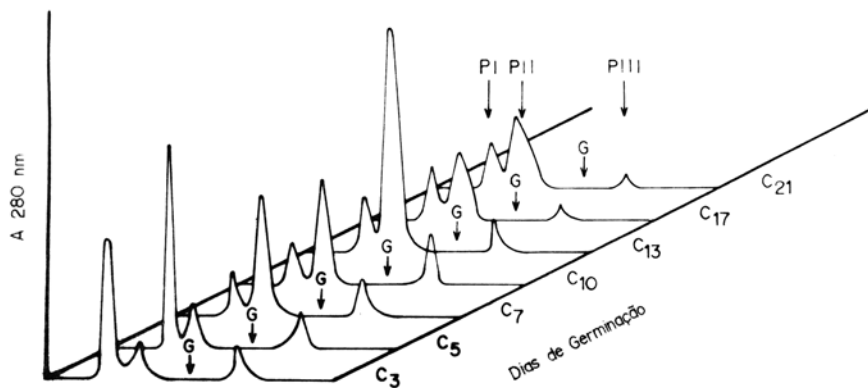


Figura 5 – Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, de extrato de cotilédones de *Canavalia brasiliensis* ao longo da germinação na presença da luz. (P_I): proteínas com PM elevado; (P_{III}): Lectina.

obtidos quando as sementes são germinadas no escuro (Moreira e Cavada, 1984), com a diferença de que na germinação na ausência de luz os cotilédones eram exauridos com 15 dias enquanto que na presença da luz, mesmo na ausência de qualquer nutriente externo, isto só ocorreu 21 dias após o início da embebição.

Quando se analisa os teores de proteínas e a atividade hemaglutinante (Figura 3) corrobora-se a idéia já surgida durante o estudo da germinação no escuro, de que a lectina de *C. brasiliensis* desaparece concomitantemente com as demais proteínas de reserva. Entretanto, quando se analisa, por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (Figura 5), o comportamento das proteínas solúveis, ao longo da germinação na luz, percebe-se nitidamente que a lectina (P_{III}) é metabolizada mais tardiamente que as proteínas de reserva (P_I). Estes resultados são evidenciados por eletroforese das proteínas solúveis dos cotilédones obtidos ao longo da germinação (Figura 4) onde percebe-se que a principal banda representante das proteínas de reserva (P_I) desaparece do 5º para o 7º dia de germinação, enquanto que a principal banda representante da lectina (P_{III}, subunidade de 26 KD) permanece ao longo do período estudado.

Em estudos anteriores foi mostrado que no escuro a lectina de sementes de *C. brasiliensis* é metabolizada de uma maneira diferenciada quando comparada com as demais proteínas de reserva cotiledonárias (Moreira e Cavada, 1984). Esta metabolização diferenciada é confirmada, agora, também na presença de luz, indicando que, mesmo fotossintetizando, esta lectina é preservada. Estes resultados reforçam a idéia de que a lectina de *Canavalia brasiliensis* não tem função apenas de proteína de reserva e que na realidade ela seria preservada por possuir outra função específica (embora ainda desconhecida) durante o processo de estabelecimento da planta. Após desempenhar seu papel, a lectina seria então metabolizada e utilizada como reserva de aminoácidos.

Referências bibliográficas

- BARKAI-GOLAN R.; D. MIRELAMN & N. SHARON. 1978. Studies on growth inhibition by lectin of *Penicillia* and *Aspergilli*. *Arch. Microbiol.* 116:119-124.
- BARONDES, S.H. 1988. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *TIBS*, 13:480-482.
- BOHLOO, B.B. & E.L. SCHMIDT. 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Science*, 1985:269-271.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye

- binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- DAZZO, F.B. & G.L. TRUCHET. 1983. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Membr. Biol.* 73:1-16.
- DIAZ, C.L., L.S. MELCHERS, J.J. HOOYKAAS, B.J.J. LUGTENBERG & J.W. KIJNE. 1989. Root lectin as a determinant of hostplant specificity in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Nature* 338:579-581.
- GOLDSTEIN, I.J., R.C. HUGHES, M. MONSIGNY, T. OZAWA & N. SHARON. 1980. What should be called a lectin? *Nature* 285:66.
- HAMBLIN J. & S.P. KENT. 1973. Possible role of phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nature*, 245:28.
- JANSEN, D.H., H.B. JUSTER & I.E. LIENER. 1976. Insecticidal action of the Phytohemagglutinin in black beans on a Bruchid beetle. *Science* 192:795-796.
- KOCOUREK, J. & V. HOREJSI. 1983. A note of the recent discussion of the term "lectin". In: T.C. BOG-HANSEN, & G.A. SPENGLER (eds) – *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Proceedings of the 5th Lectin Meeting. vol. 3, Walter de Gruyter. Berlin-New York.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- MIRELMEN, D., E. GALUN, N. SHARON & R. LOTAN. 1975. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature* 256:414-416.
- MISHKIND, M., N.V. RAIKHELL, B.A. PALEVITZ & K. KENETH. 1982. Immunocytochemical localization of wheat germ agglutinin in wheat. *J.Cell. Biol.* 92:753-764.
- MOREIRA, R.A. & B.S. CAVADA. 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol. Plant.* 26:113-120.
- MOREIRA, R.A. & J.C. PERRONE. 1977. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 59:783-787.