

Prova  
m.c.

R. 2757

Impl.

Sete exemplares com o mesmo a ser p. l. e  
da tese defendida pela candidata  
Neuza Maria Barbosa e aprovada pela banca

NEUZA MARIA BARBOSA



m.t. aut.

18/12/90

SEPARAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DA LEGHEMOGLOBINA DE STYZOLOBIUM ATERRIMUM (MUCUNA PRETA) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador : Profa. Dra. NILCE CORREA MEIRELLES

m.t. aut.

20/11/90 924

Campinas - S.P.

1990

B234s  
13167/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Agradeço ao Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecno-  
lógico (CNPq) e a Fundação de Apoio  
à Pesquisa da UNICAMP (FAP) pelo  
financiamento deste projeto.

New Zealand Maori proverb

"Ko tou rourou Me Taku rourou  
Ka Kai nga iwi".

"With your basket of food and  
my basket of food all the people  
will be fed."

## ABREVIATURAS

Abs	= absorvância
AA	= aminoácido
ATP	= adenosina 5-trifosfato
DEAE	= dietil amino etil
EDTA	= ácido etileno diamino tetraacético
Hb	= hemoglobina
LegHb	= Leghemoglobina
LegHb(Fe <sup>3+</sup> )	= Leghemoglobina oxidada
LegHb(Fe <sup>2+</sup> )	= Leghemoglobina reduzida
MES	= ácido morfolino etano sulfônico
PVPP	= polivinil polipirrolidona
SDS	= dodecil sulfato de sódio
TEMED	= N,N,N,N - tetrametil etilenodiamino
Tris	= tris(hidroximetil aminometano)

## ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAIS.....	15
MÉTODOS.....	16
1. Estabelecimento da condição adequada para o cultivo de mucuna preta.....	16
1.1 Germinação.....	16
1.2 Transplante em vasos.....	17
1.3 Coleta dos nódulos.....	18
2. Purificação e separação dos componentes da legHb de mucuna preta.....	19
3. Determinação da concentração de leghemoglobina.....	22
3.1 Método da piridina-hemocromôgenio.....	22
3.2 Leitura direta da absorvância.....	22
4. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	23
5. Preparação da legHb oxigenada.....	24
6. Propriedades ópticas da legHb.....	25
7. Determinação do pK da transição ácida-alcalina da legHb oxidada.....	25
8. Determinação da constante de afinidade (k) da legHb pelo anion acetato.....	25

RESULTADOS.....	27
1. Efetividade dos nódulos em função da origem da estirpe de <i>Rhizobium</i> .....	27
2. Efetividade dos nódulos nos diferentes estádios de desenvolvimento da mucuna preta.....	28
3. Purificação da legHb dos nódulos de mucuna preta....	29
4. Separação dos componentes da legHb total no estágio vegetativo ou na floração.....	31
5. Avaliação quantitativa dos componentes em relação à legHb total durante a floração.....	33
6. Separação dos componentes da legHb de nódulos de plantas em frutificação.....	34
7. Avaliação quantitativa dos componentes em relação a legHb total durante a frutificação.....	36
8. Variação quantitativa dos componentes em função do estágio de desenvolvimento.....	37
9. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo SDS (SDS-PAGE) da legHb total e dos componentes....	38
10. Eletroforese em gel de poliacrilamida 17,5% de marcadores de baixo peso molecular.....	38
11. Determinação do peso molecular da legHb e dos componentes em SDS-PAGE 17,5%.....	42
12. Espectro de absorção da legHb oxigenada na região visível entre 350-650 nm.....	44
13. Espectro de absorção da legHb reduzida na região visível entre 350-650 nm.....	44

14. Influência do pH no espectro de absorção da legHb oxidada na região entre 500-700 nm.....	47
15. Influência do pH na região do entre 350-450 nm.....	47
16. Transição ácida-alcalina da legHb.....	52
17. Determinação do pK da transição ácida-alcalina do componente I.....	54
18. Determinação do pK da transição ácida-alcalina do componente V.....	56
19. Combinação da LegHb oxidada com o anion acetato.....	59
20. Determinação da Constante de Afinidade (K) da LegHb pelo anion acetato.....	62
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÕES.....	78
RESUMO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

## INTRODUÇÃO

As leghemoglobinas (legHb) pertencem à família de hemoproteínas capazes de se ligar reversivelmente ao oxigênio ( $O_2$ ), que são sintetizadas nos nódulos de raiz de plantas leguminosas durante a fixação simbiótica de nitrogênio ( $N_2$ ).

Os nódulos de raiz de plantas leguminosas, são estruturas formadas em resposta à infecção por bactérias do gênero *Rhizobium* que após reconhecerem o hospedeiro, penetram em suas raízes e passam a se dividir sucessivamente formando um filamento de infecção, que cresce rumo ao cortex da raiz. O filamento ao atingir o cortex, provoca a diferenciação destas células que passam a se dividir intensamente e formam os nódulos de raiz (Sprent, 1984).

Durante a proliferação das bactérias no interior das raízes, várias modificações morfológicas e fisiológicas ocorrem e o aumento de volume em até 40 vezes pode ser observado. Estas bactérias modificadas são denominadas de bacteróides. A captação dos bacteróides pela célula do hospedeiro ocorre por um processo de endocitose, no qual a membrana que circunda o bacteróide, denominada de membrana peribacteróide forma um tipo de envelope que pode conter um ou vários bacteróides dependendo da espécie de hospedeiro. Em ervilha, a divisão do bacteróide é seguida da divisão da membrana, resultando em envelopes contendo apenas um bacteróide. Em soja apenas os bacteróides se dividem e os envelopes podem conter vários bacteróides (Dixon e Wheeler, 1986).

A infecção das raízes por *Rhizobium* pode ocorrer de duas maneiras: a bactéria penetra na raiz após ter ocorrido uma lesão que pode ser provocada pela emissão de raízes secundárias ou elas podem penetrar através da epiderme, neste caso a infecção pode ocorrer pela entrada nas células do pelo da raiz ou pela penetração direta nas células da epiderme (Sprent e Faria, 1989).

Quanto aos nódulos, o tamanho e a morfologia é característica do hospedeiro e dois tipos principais podem ser formados: nódulos de crescimento determinado e indeterminado. Os de crescimento determinado são esféricos podendo adquirir forma oval quando maduros. Os de crescimento indeterminado são maiores e podem se ramificar formando diversas pontas de crescimento contínuo, sendo denominados de astragalóide (Corby, 1981).

As bactérias do gênero *Rhizobium*, agrupadas em espécies em função do hospedeiro que infectam, são atualmente consideradas como pertencentes a dois gêneros em função das características de crescimento em meio de cultura. As estirpes de crescimento rápido como *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* etc., continuam pertencendo ao gênero *Rhizobium* enquanto as estirpes de crescimento lento como *R. lupini*, *R. japonicum* etc. passaram a pertencer ao gênero *Bradyrhizobium* (Trinick e Hadobas, 1989).

Independente do gênero a que pertençam, estas bactérias são aeróbicas e infectam especificamente as plantas da família leguminosae, conhecendo-se uma única exceção que é a nodulação de *Parasponia* sp. uma planta não leguminosa pertencente à família Ulmaceae, infectada por uma estirpe de *Bradyrhizobium* (Trinick e Hadobas, 1989).

A redução do  $N_2$  pela nitrogenase, enzima encontrada apenas em procariotos tanto aeróbicos como anaeróbicos, necessita de uma fonte geradora de ATP e de poder redutor além de condições anaeróbicas uma vez que na presença de  $O_2$  a enzima é irreversivelmente inativada (Yates, 1980)

Nos organismos aeróbicos de vida livre, diferentes mecanismos foram desenvolvidos para permitir que respiração e a fosforilação oxidativa, que são as fontes geradoras de ATP e poder redutor, ocorram concomitantemente com a redução de  $N_2$ . Em algumas cianobactérias que fazem fotossíntese a fixação de  $N_2$  ocorre durante o período de escuro. Em outras, a presença de células diferenciadas, denominadas heterocistos nas quais a parede celular é mais espessa, a difusão de  $O_2$  é limitada permitindo a fixação de  $N_2$  por estas células. Em azotobacter, quando a tensão de  $O_2$  é alta, a produção de ATP é desacoplada e o consumo de  $O_2$  é acelerado. Quando os níveis de  $O_2$  diminuem, a produção de ATP volta a ser acoplada à respiração e a fixação de  $N_2$  recomeça. Este mecanismo é denominado de Proteção Respiratória. (Dixon e Wheeler, 1986).

Nos sistemas simbióticos associados a *Rhizobium* a fixação de  $N_2$  pelos bacteróides é mediada pela legHb que é sintetizada nas células do nódulo e atua facilitando a difusão do  $O_2$  para respiração e fosforilação oxidativa do bacteróide, mantendo a sua concentração em níveis baixos para não ocorrer a inativação do complexo nitrogenase que atua no citoplasma do bacteróide (Appleby, 1974; Bergersen, 1978).

A habilidade para fixação de  $N_2$  nos nódulos, está diretamente relacionada com a presença da legHb. Estirpes de *Rhizobium*

deficientes na capacidade de síntese do grupo heme, formam nódulos que não fixam  $N_2$  (Noel e colab., 1982). A síntese da nitrogenase pelo bacteróide é posterior à síntese da legHb e os eventos ocorrem na seguinte ordem: a proliferação do bacteróide provoca condições microaerófilas as quais induzem a síntese do grupo heme pelo bacteróide (Keithley e Nadler, 1983). O grupo heme é transportado para o citoplasma do hospedeiro por um processo ainda desconhecido, onde se une à globina que está sendo sintetizada no retículo endoplasmático do hospedeiro. A legHb funcional passa a fornecer  $O_2$  para a respiração do bacteróide que em condições controladas de  $O_2$ , sintetiza a nitrogenase (Verma e colab., 1979).

A efetividade de fixação de  $N_2$  pelo bacteróide, é dependente da eficiência da fosforilação oxidativa. Considerando-se que os níveis de  $O_2$  são necessariamente baixos, os bacteróides desenvolveram vias alternativas para o transporte de elétrons, as quais tem sido demonstradas pelo uso de inibidores das oxidases. Em *R. japonicum* a citocromo oxidase aag que é encontrada nas bactérias de vida livre e atua como oxidase terminal é substituída no bacteróide por 4 tipos de oxidases: citocromo c 552; c 554; P 450 e P 428. Estudos com bacteróides isolados e mantidos em diferentes concentrações de  $O_2$  demonstraram que 2 tipos de oxidases estão envolvidos na respiração do bacteróide: um de alta afinidade atua em concentrações baixas de  $O_2$  e promove uma fosforilação oxidativa eficiente com consequente atividade da nitrogenase. Esta condição é denominada de fase eficiente da respiração. Quando a tensão de  $O_2$  é alta, as oxidases de baixa afinidade atuam porém a fosforilação e atividade da nitrogenase são inefetivas, esta si-

tuação é denominada de fase ineficiente da respiração. Estas duas fases da respiração, também ocorrem quando a legHb ou outra hemo-proteína parcialmente oxigenada é adicionada, porém na fase eficiente ( $O_2$  baixo) a produção de ATP e a atividade da nitrogenase é mais eficiente do que na ausência de um transportador de  $O_2$  (Appleby, 1984).

A origem genética da legHb como produto do genoma da planta e não do *Rhizobium* foi comprovada pela biossíntese "in vitro" da globina a partir do mRNA isolado dos nódulos de soja (Verma e colab., 1974) e por testes de hibridização utilizando o DNA complementar (cDNA) produzido a partir deste mRNA (Baulcombe e Verma, 1978).

As legHb possuem estrutura semelhante às mioglobinas animais, sendo monoméricas com peso molecular (PM) entre 15000 e 18000. Funcionalmente diferem destas em relação à afinidade pelo  $O_2$  e também por outros ligantes (Dilworth, 1980)

O primeiro trabalho experimental, confirmando que o pigmento responsável pela coloração rosa observada na parte interna dos nódulos era uma hemoglobina, foi executado por Kubo em 1939, que extraiu o pigmento dos nódulos de soja e demonstrou por análise espectrofotométrica que as bandas de absorção do pigmento em presença de  $O_2$ ; monóxido de carbono (CO) e cianeto situam-se nas mesmas posições encontradas para as hemoglobinas animais.

Após a descoberta de Kubo, estudos intensivos com a legHb foram executados por Ellfolk (1960) o qual demonstrou que a legHb de soja é composta de pelo menos dois tipos principais de moléculas as quais foram separadas por cromatografia em DEAE-celulose.

Estes componentes, denominados de lento e rápido em função da sua migração eletroforética, foram cristalizados e a sua composição de aminoácidos (AA) foi determinada e comparada com a mioglobina humana. Entre os componentes a variação na composição de AA foi pequena, porém em relação à mioglobina diferenças significativas foram observadas em relação ao teor de histidina e dos AA básicos arginina e lisina os quais são encontrados em menores quantidades na legHb e lhes confere um caráter ácido, enquanto a mioglobina é neutra. Apesar desta diferença na composição de AA, as legHb de soja mostraram-se semelhantes à mioglobina em relação ao PM, teor de ferro e ausência de cisteína. O PM estimado em 16000 foi indicativo de estrutura monomérica (Ellfolk 1961 a).

Quanto às propriedades químicas as legHb diferem das mioglobinas animais por formarem complexos com o acetato e nicotinato. O acetato liga-se à legHb oxidada e lhe confere uma coloração verde clara, cujo espectro de absorção é característico. A substituição do acetato por ácidos carboxílicos de cadeia mais longa como propionato ou valerato, não alteram as posições dos picos de absorção (Ellfolk, 1961 b). O nicotinato, ligante de natureza endógena, inicialmente denominado de ligante X devido à ausência de informações sobre a sua natureza química, foi identificado por Appleby, (1973) o qual caracterizou os complexos das formas oxidada e reduzida e suas respectivas afinidades por este ligante.

Com relação aos ligantes gasosos, a legHb de soja tem uma alta afinidade tanto pelo  $O_2$  quanto pelo CO. Estudos cinéticos, mostraram que uma pressão de  $O_2$  de apenas 0,04 mm de Hg é suficiente para se obter 50% de oxigenação ( $p_{1/2}$ ), enquanto a mio-

globina de cavalo necessita de uma pressão de 0,7 mm de Hg para atingir o mesmo nível de oxigenação, sendo portanto a afinidade da legHb 18 vezes maior. Quanto ao CO, a afinidade da legHb é 20 vezes maior, (Wittenberg e colab., 1972).

Com a identificação do nicotinato, a purificação da legHb foi melhorada acrescentando-se uma etapa para eliminação deste ligante endógeno antes da separação dos isômeros. A metodologia descrita por Appleby (1975), combinando a oxidação com ferricianeto de potássio e posterior filtração em gel em pH alcalino, mostrou-se adequada por eliminar ao mesmo tempo o oxidante e o nicotinato. Esta metodologia tem sido empregada para purificação das legHb de diferentes espécies de leguminosas, com pequenas variações (Dilworth, 1980).

A separação dos componentes da legHb de soja após eliminação do nicotinato indicou a presença de seis componentes, dos quais dois não foram bem separados (Appleby, 1975). Este problema foi resolvido pelo emprego da técnica de focalização isoelétrica, com a qual foi demonstrado que a legHb total de soja é composta de 4 componentes principais A; C<sub>1</sub>; C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> e 4 componentes secundários (Fuchsman e Appleby, 1979). Os componentes secundários foram posteriormente identificados como produto de acetilação do N-terminal dos componentes principais (Whittaker e colab., 1981).

A confirmação definitiva da existência de múltiplas espécies moleculares foi obtida com a identificação de 4 genes distintos para a legHb de soja. Estes genes A; C<sub>1</sub>; C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> possuem a mesma estrutura e a região codificadora de AA é interrompida (introns) em 3 posições idênticas, o que os diferencia dos genes das hemo-

globinas (Hb) animais que possuem apenas 2 introns. A posição de 2 dos introns da legHb coincide com a posição dos da Hb animal e o terceiro intron situado entre os dois que são comuns a ambas, foi perdido nas Hb animais durante a evolução, sendo o gene da legHb considerado mais primitivo (Hyldig-Nielsen e colab., 1983).

Com a padronização da metodologia de purificação da legHb, a presença de múltiplas espécies moleculares tem sido observada em diferentes espécies de leguminosas. Em alfafa (Jing e colab. 1982) e ervilha (Uheda e Syõno, 1982 a) foram identificados 5 componentes. Em *Sesbania rostrata* que forma nódulos no caule e na raiz, foram obtidos 7 componentes nos dois tipos de nódulos (Bogusz e colab. 1987). A quantidade relativa dos componentes de uma mesma espécie é dependente da idade do nódulo.

A variação na quantidade dos componentes durante o desenvolvimento dos nódulos, associada à afinidade pelo  $O_2$  indica que os componentes predominantes nos nódulos jovens tem menor afinidade pelo  $O_2$  que os componentes predominantes em nódulos maduros. Em soja o componente C predominante nos nódulos jovens tem uma constante de afinidade  $K = 66$  nM, enquanto para o componente A predominante em nódulos maduros,  $K = 47$  nM. Em ervilha, esta correlação também foi observada. A hipótese sugerida para explicar esta correlação, considera que a predominância de componentes com maior afinidade nos nódulos maiores (maduros), poderia estar relacionada com um possível mecanismo capaz de compensar as restrições para difusão do  $O_2$ , as quais são devidas à maior complexidade destes nódulos (Uheda e Syõno, 1982 b).

A comparação entre as sequências de aminoácidos dos isômeros de uma mesma espécie de planta, mostra uma pequena variação. As legHb I e II de tremoço diferem na sequência em 13% e ambas possuem 153 AA. A legHb A de soja (143 AA) C<sub>3</sub> (144 AA) possuem apenas 8% de diferença na sequência (Hyldig-Nielsen e colab., 1982). Este alto grau de homologia dentro de uma mesma espécie, é bastante reduzido quando se compara as legHbs de espécies diferentes de leguminosas: a legHb A de soja difere da sequência da legHb I de tremoço em 48%. O grau de homologia é mais reduzido ainda quando se compara a legHb A de soja com a mioglobina animal cujas sequências de AA diferem em 85%. Apesar desta variação no grau de homologia, todas as legHb e hemoglobinas animais conhecidas, possuem regiões críticas, nas quais a sequência AA é conservada. (Appleby, 1984).

A grande diferença entre as sequências de AA da legHb e da mioglobina, reflete em um arranjo estrutural diferente. A análise por difração de raio X da legHb II de tremoço (Arutyunyan, 1981) e da legHb A de soja (Ollis e colab., 1983), sugere que em ambas a cavidade que aloja o grupo Heme é maior que a encontrada para as mioglobinas, podendo este fator tornar o grupo heme das legHb mais acessível aos ligantes O<sub>2</sub> e CO, os quais se combinam com a legHb mais rapidamente do que com a mioglobina (Stetzkowski e colab. 1985).

A alta afinidade da legHb pelo O<sub>2</sub> determinada através de suas propriedades cinéticas, é devida a uma associação extremamente rápida e uma dissociação moderadamente lenta. A legHb A de soja tem uma constante de velocidade para associação  $K_a =$

$1,18 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , enquanto a constante para dissociação  $K_d = 5,55 \text{ s}^{-1}$ , em pH entre 7,0 e 9,0 a  $20^\circ \text{ C}$ . Estes valores resultam em uma constante de equilíbrio de dissociação  $K = 47 \text{ nM}$ , onde  $K = K_d/K_a$  e corresponde à concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido que promove 50% de oxigenação da legHb e indica a sua afinidade pelo ligante (Appleby e colab., 1983).

As propriedades cinéticas da legHb, são bastante influenciadas pelo pH. Em pH ácido a afinidade pelo  $\text{O}_2$  aumenta sendo este fato atribuído à extrema mobilidade da histidina distal nas moléculas de legHb. Em pH neutro a histidina está livre, porém em pH ácido, ela está protonada e forma pontes de hidrogenio com a molécula de  $\text{O}_2$  ligada ao átomo de ferro, estabilizando esta ligação e diminuindo a dissociação do  $\text{O}_2$ , com conseqüente aumento da afinidade em 5 vezes (Appleby e colab., 1983).

Embora as legHb de soja sejam as mais bem caracterizadas, as suas propriedades se estendem às legHb de outras leguminosas, porém as afinidades por ligantes variam conforme a espécie de planta (Appleby, 1984).

Até 1984, a presença de hemoglobina (Hb) no reino vegetal era restrita aos nódulos de raiz de plantas leguminosas, porém o aprimoramento técnico para o isolamento de Hb dos nódulos de plantas não leguminosas, demonstrou que *Parasponia* e *Casuarina* noduladas respectivamente por *Bradyrhizobium* e *Frankia* (actinomiceto), sintetizam Hb em seus nódulos. Em *Parasponia* foi identificado um único tipo molecular de estrutura dimérica contendo duas subunidades idênticas (Kortt e colab., 1985). Por outro lado em *Casuarina* foram isolados tres componentes principais, todos de

estrutura monomérica (Fleming e colab., 1987). Apesar desta diferença estrutural, as propriedades funcionais destas Hb são semelhantes às das legHb, indicando o mesmo papel fisiológico.

A caracterização dos genes destas não leguminosas indicou que a sua estrutura é semelhante ao gene para legHb de soja, contendo tres introns em posições idênticas. A sequência de nucleotídeos do gene de *Parasponia* apresentou 50% de homologia com o gene da legHb de soja. A presença de um único gene em *Parasponia* confirmou os resultados obtidos para a Hb isolada e este evento não foi ainda observado nas demais plantas noduladas, que possuem vários genes para a síntese da legHb os quais provavelmente são produtos da duplicação gênica durante a evolução (Landsman e colab., 1986)

Mais recentemente, a presença do gene para Hb em raízes de plantas não leguminosas noduladas e não noduladas tem sido demonstrada por análise direta do genoma. Em *Trema*, um gênero pertencente à mesma família de *Parasponia* mas que não forma nódulos de raiz, foi isolado um gene para Hb de pontas de raízes em crescimento (Bogzs e colab., 1988). Em *Parasponia* e *Casuarina* também foram identificados genes para Hb, quando as raízes foram crescidas em condições estéreis. A estrutura destes genes de raízes é a mesma observada para os genes codificadores das hemoglobinas nodulares. O papel fisiológico destas hemoglobinas nas raízes não está ainda esclarecido, mas a proposta de que elas atuariam no metabolismo respiratório é um forte candidato e isto implicaria numa distribuição mais ampla para o gene da Hb no reino vegetal, sendo possível a sua presença em todas as plantas (Ap-

pleby e colab., 1988).

As propriedades destas Hb de raízes não estão ainda determinadas. Devido à pequena quantidade existente nas raízes a sua purificação não foi ainda possível. Esta baixa concentração da Hb de raízes levou à proposta de que a sua função nas raízes é de atuar como sinalizadora de vias metabólicas a serem ativadas em função do seu grau de oxigenação. Em condições de "deficit" de  $O_2$ , as raízes passariam de uma via aeróbica para uma anaeróbica induzida pela baixa oxigenação da Hb (Wittenberg e Wittenberg, 1990).

Do ponto de vista evolutivo, a semelhança na estrutura dos genes para hemoglobinas de nódulos ou de raízes, indica uma evolução linear e descontínua entre as dicotiledôneas, porém a identificação destes genes de raízes em um maior número de plantas não leguminosas, poderá ajudar a estabelecer uma possível relação filogenética. Nas leguminosas não foram ainda identificados genes para Hb nas raízes, sendo considerada a possibilidade de existir um gene bastante diferenciado que não hibridiza com os cDNA disponíveis até o momento. Nas não leguminosas os genes de raiz e dos nódulos são iguais, porém a forma de expressão é diferente (Bogzs, 1988).

A origem do gene da hemoglobina no reino vegetal é ainda bastante discutida e existem duas propostas: a primeira hipótese defende uma transferência horizontal a partir do reino animal através de um vetor, sendo sugerido o inseto *Chironomus* cujo gene da hemoglobina não possui nenhum intron (Runnegar, 1984). A segunda hipótese defende uma evolução vertical do gene da Hb no

reino vegetal e animal independentes, tendo sido ambas herdadas de um mesmo ancestral primitivo há aproximadamente 1,2 bilhões de anos (Brown e colab. 1984). Ambas hipóteses têm argumentos favoráveis, porém a identificação do gene da Hb em vegetais inferiores às angiospermas não foi ainda obtida e isto reforça a evolução horizontal, enquanto a evolução vertical baseada na estrutura dos genes ainda depende de um maior número de genes isolados de diferentes famílias de dicotiledôneas para se estabelecer uma sequência evolutiva (Appleby e colab., 1988).

A existência de parentesco entre as hemoglobinas animais e vegetais é comprovada tanto pelas regiões que conservam as sequências de AA essenciais para a estrutura da globina, como pela estrutura dos seus genes. No caso dos genes das hemoglobinas animais a perda de um intron durante a evolução, ocorreu numa posição tal que pela análise da estrutura das globinas pode-se prever que o mesmo tenha existido em genes mais primitivos que os atuais. Os modernos métodos para detecção de genes para hemoglobinas em organismos que a sintetizam em concentrações muito baixas é um importante avanço que poderá determinar o ponto exato na escala evolutiva do gene da hemoglobina, que resultou na perda do terceiro intron conservado nas hemoglobinas vegetais (Riggs, 1990).

A detecção da Hb no reino vegetal através do isolamento do gene pode estabelecer as relações filogenéticas entre as dicotiledôneas, porém a sua função fisiológica é dependente da caracterização destas proteínas sendo necessário potencializar a sua síntese para viabilizar a sua purificação.

Nas leguminosas as legHb sintetizadas nos nódulos podem ser isoladas facilmente desde que existam estirpes de *Rhizobium* eficientes para nodulação. As espécies leguminosas de interesse agrícola que têm alto potencial para fixação de  $N_2$  são as mais estudadas quanto às suas legHb, porém um grande número de espécies leguminosas noduladas não possui ainda as suas legHb caracterizadas, principalmente pelas dificuldades em se obter nódulos efetivos quando não existem estirpes de *Rhizobium* selecionadas eficientes para nodulação.

Selecionou-se neste trabalho, uma leguminosa tropical *Stylobium atterimum* (mucuna preta) que é bastante utilizada para adubação verde e possui alto potencial para nodulação em condições naturais. A presente tese contém dados referentes a extração e purificação da legHb dos nódulos de mucuna preta nodulada por *Rhizobium* nativo e pela estirpe selecionada SMS-601 em diferentes estádios de desenvolvimento da planta bem como dados de algumas das propriedades físico-químicas dessa hemoproteína.

## MATERIAIS

1. Material vegetal: nódulos de mucuna preta (*Styrolobium atterrimum* Pip. et Tracc.), leguminosa papilionácea.
2. As sementes de mucuna preta foram cedidas pelo Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (São Paulo).
3. As estirpes de *Rhizobium* SMS-601, selecionadas para mucuna preta foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas.
4. Os reagentes de qualidade analítica foram adquiridos das seguintes fontes:
  - 4.1 Sigma Chemical Company: DEAE-celulose (0,92 mEq/g); Coomassie Brilliant Blue R-250; Acrilamida; N N'-metilenebisacrilamida; TEMED; Persulfato de amônio; Glicerol; SDS; 2-Mercaptoetanol; Tris e Marcadores de peso molecular.
  - 4.2 Pharmacia: Sephadex G-25 (20 - 40 u).
  - 4.3 Merck e Ecibra: solventes; ácidos; bases e sais.

## MÉTODOS

### 1. ESTABELECIMENTO DA CONDIÇÃO ADEQUADA PARA O CULTIVO DE MUCUNA PRETA.

As condições de cultivo de plantas leguminosas com potencial máximo para fixação de nitrogênio podem ser estabelecidas em casa de vegetação quando existem estirpes de *Rhizobium* eficientes disponíveis. No caso de mucuna preta, foi tentado o estabelecimento da condição de cultivo testando-se o desenvolvimento das plantas inoculadas com *Rhizobium* selecionado e plantas não inoculadas, isto é a formação de nódulos foi consequência da infecção por *Rhizobium* nativos presentes no solo utilizado.

#### 1.1 Germinação

As sementes previamente selecionadas foram embebidas em água destilada durante dez minutos. Desprezaram-se as que permaneceram na superfície e distribuíram-se as demais em bandejas de plástico forradas com papel de filtro umedecido. Vedaram-se as bandejas com plástico transparente "magipak", deixando-as em condições ambientais não controladas e constantemente úmidas. A protusão da radícula ocorreu após 48 horas em 98% das sementes.

## 1.2 Transplante em vasos

As sementes germinadas foram transferidas para vasos na segunda quinzena de setembro. Os vasos foram agrupados em lotes da seguinte maneira:

Lote-1: Plantas inoculadas e cultivadas em casa de vegetação.

Prepararam-se 30 vasos com capacidade de 5 litros com vermiculita previamente lavada e plantaram-se 3 sementes em cada vaso. Após a emissão da primeira folha trifoliolada (uma semana após o plantio), fez-se o desbaste deixando-se apenas 2 plantas por vaso que foram inoculadas aplicando-se 2 ml de suspensão de *Rhizobium* SMS-601 por planta. Os vasos foram irrigados duas vezes por semana com 200 ml de solução nutritiva deficiente em nitrogênio contendo a seguinte composição: fosfato de potássio monobásico 1 mM; sulfato de potássio 2 mM; sulfato de magnésio 2 mM; sulfato de cálcio 2 mM; ácido bórico 46 µM; ácido molibdílico 0,5 µM; cloreto de manganês 9,0 µM; sulfato de cobre 0,3 µM; sulfato de zinco 0,8 µM. No momento da aplicação adicionava-se a cada litro de solução nutritiva 1 ml de uma solução composta de sulfato ferroso 9 mM e EDTA di-sódico 9 mM. Durante o primeiro mês de desenvolvimento as plantas apresentaram sintomas de deficiência na fixação de  $N_2$  (folhas amarelas) sendo necessária a adição semanal de 100 ml de nitrato de potássio 1 mM por vaso, a partir da queda das folhas cotiledonares. A coleta dos nódulos foi feita 75 dias após o plantio estando as plantas em estágio vegetativo.

Lote-2: Plantas não inoculadas e mantidas em casa de vegetação.

Prepararam-se 30 vasos com capacidade de 5 litros com terra contendo adubação orgânica e plantaram-se 3 sementes por vaso. O desbaste foi feito do mesmo modo que o lote-1. Não foi utilizado nenhum tipo de adubação uma vez que estas plantas não apresentaram sintomas de deficiência em fixação de nitrogênio. A coleta dos nódulos foi feita 75 dias após o plantio no estágio vegetativo.

Lote-3: Plantas não inoculadas e cultivadas em condições naturais.

Como as plantas cultivadas em solo (lote-2) apresentaram um melhor desenvolvimento, optou-se pelo cultivo de plantas sem inoculação. Prepararam-se 90 vasos de maneira idêntica à empregada no lote-2. Os vasos foram agrupados em 3 lotes de 30 e a coleta dos nódulos foi efetuada em diferentes estádios de desenvolvimento.

Lote-3.1: estágio vegetativo, 75 dias após o plantio.

Lote-3.2: estágio de floração, 105 dias após o plantio.

Lote-3.3: estágio de frutificação, 150 dias após o plantio.

### 1.3 Coleta de nódulos

Cortou-se a parte aérea deixando-se 10 cm de caule e transferiu-se o sistema radicular para uma peneira, mantida sob um fluxo contínuo de água corrente. Após eliminar o excesso de terra os nódulos foram coletados e colocados em um recipiente contendo

água. Lavaram-se os mesmos até eliminação da terra ou vermiculita. Os nódulos limpos foram espalhados sobre papel de filtro para absorção do excesso de água e o peso fresco foi determinado. Armazenaram-se os mesmos em condições refrigeradas por períodos não superiores a tres dias, ou congelaram-se os mesmos.

## 2. PURIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DA LEGHB DOS NÓDULOS DE MUCUNA PRETA.

Utilizou-se o método descrito por Bogusz e colab. (1987) com modificações. Todas as operações foram executadas entre 0°C e 4°C.

217 g de nódulos colhidos de plantas em estágio de floração (3,5 meses) foram homogeneizados com 3 volumes de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,8 (3 ml de tampão/g de nódulo), durante 2 minutos no "Mixer-Sorvall" a velocidade máxima. O extrato de tecido nodular foi centrifugado a 15.000xg durante 15 minutos. Esta condição para centrifugação, foi utilizada em todas as etapas subsequentes. O precipitado foi desprezado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio sólido até 55% de saturação. Após completa dissolução do sal (1 hora de agitação), centrifugou-se o material. Desprezou-se o precipitado. O sobrenadante de coloração marrom escura devido à grande quantidade pigmentos presentes nos nódulos de mucuna preta, foi levado a 80% de saturação com sulfato de amônio, nas mesmas condições descritas para a primeira saturação (55%). A legHb assim como os pigmentos foram coletados por centrifugação da fração precipitada entre 55% e 80% de saturação com sulfato de amônio. O precipitado foi dissolvido no menor volume possível de tampão fosfato de potássio 3 mM pH 7,0 e dia-

lisado contra o mesmo tampão até completa eliminação do sal. O material precipitado durante a diálise foi removido por centrifugação.

#### Eliminação dos pigmentos por cromatografia em DEAE-celulose

O material dialisado foi aplicado a uma coluna de DEAE-celulose (2 x 30 cm) equilibrada com tampão fosfato 3 mM pH 7,0. Nesta condição, os pigmentos ficam retidos no topo da coluna e a legHb foi eluída em uma única banda, pela lavagem da coluna com tampão fosfato 50 mM pH 7,0. A presença de legHb no eluído foi determinada pela leitura da absorvância a 405 nm e os tubos cujos valores foram maiores ou iguais a 0,5 foram reunidos e concentrados por precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação. Após centrifugação, o sobrenadante amarelo claro foi desprezado e o precipitado vermelho escuro, contendo toda legHb foi ressuspensionado em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,2 e dialisado contra o mesmo tampão, porém na concentração 10 mM até eliminação do sulfato. O dialisado foi centrifugado e 20 ml de sobrenadante verde claro devido à complexação da legHb com acetato, foram coletados. A concentração da legHb nesta etapa foi 0,69 mM, que corresponde a 220 mg de legHb total. O grau de pureza da legHb foi analisado por eletroforese e não foi observada a presença de proteínas contaminantes.

### Oxidação da legHb e cromatografia em Sephadex G-25

A conversão da legHb para a forma  $\text{Fe}^{3+}$  foi feita pela adição de ferricianeto de potássio sólido na proporção de 4 mEq/mMol de legHb. 20 ml da solução de legHb 0,69 mM foram mantidos sob agitação e 18 mg de ferricianeto foram adicionadas lentamente. A oxidação completa da legHb ocorreu entre 5 e 10 minutos após adição do oxidante. A eliminação do ferricianeto foi feita aplicando-se a mistura a uma coluna de Sephadex G-25 de (2 x 30cm) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,2. A legHb foi eluída lavando-se a coluna com o tampão de equilíbrio, antecedendo a banda amarela de ferricianeto, que se desloca em segundo lugar. Os tubos contendo legHb foram reunidos, obtendo-se 24 ml de uma solução 0,42 mM que corresponde a 163 mg de legHb total.

### Separação dos componentes por cromatografia em DEAE-celulose

O fracionamento da legHb total em seus respectivos componentes foi feito por cromatografia em DEAE-celulose previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,2. Montou-se uma coluna de (2,5 x 15 cm) e aplicou-se 163 mg de legHb oxidada diluída em 24 ml. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio, coletando-se frações de 8 ml para leitura da absorvância em 546 nm. Após terem sido eluídos 3 componentes, aplicou-se um gradiente linear composto de 200 ml de tampão acetato de sódio 10 mM e 200 ml de tampão acetato 100 mM, ambos pH 5,2, eluindo-se mais 2

componentes pelo aumento da força iônica. Os tubos de cada pico foram reunidos e dialisados contra água destilada para eliminação do acetato de sódio. Os componentes separados foram concentrados pela passagem do eluído em pequenas colunas (seringas de 10 ml) de DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato 3 mM pH 7,0. A legHb fica totalmente presa na resina sendo eluída por aumento da força iônica do tampão para 50 mM. O eluído concentrado foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

### 3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEGHEMOGLOBINA.

#### 3.1 Método da Piridina-Hemocromôgenio

Adotou-se o procedimento descrito por Dilworth (1980). As soluções contendo legHb foram misturadas com igual volume de solução de piridina 4,2M em NaOH 0,2M. O complexo piridina-hemocromôgenio oxidado foi reduzido pela adição de alguns cristais de dititionito de sódio e a absorvância determinada a 556 nm. O coeficiente de extinção milimolar (E mM) é 34,6. Sabendo-se a concentração mM calculou-se a concentração em mg/ml considerando-se o P.M. de 16.000.

#### 3.2 Leitura direta da Absorvância

Utilizou-se o coeficiente de extinção milimolar determinado por (Appleby e colab. 1973) para legHb de soja. As amostras oxidadas foram diluídas em tampão Mes 0,1M pH 5,3 e a Absorvância foi determinada a 404 nm. Neste comprimento de onda o EmM é igual a 151.

#### 4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS: (SDS-PAGE).

Utilizou-se o sistema de placas descrito por Chrambach e Rodbard (1982). As concentrações de acrilamida para o gel de separação adequadas foram 15% e 17,5%.

##### Composição do gel de separação e de concentração

Soluções estoque	Volume (ml)		
	Gel de separação 15%	Gel de separação 17,5%	Gel de con- centração
Acrilamida 30%	15,0	17,5	1,0
Bisacrilamida 1%	2,6	2,2	1,0
Tris-HCl 1,5M pH 8,7	7,5	7,5	----
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	----	----	2,5
Agua bidestilada	4,5	2,4	5,35
Persulfato de amônio 10%	0,1	0,1	0,05
SDS 10%	0,3	0,3	0,1
TEMED	0,01	0,01	0,005
Volume final	30	30	10

##### Preparo das amostras

As amostras contendo em torno de 1 mg/ml de proteínas foram diluídas 1:2 em tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 contendo glicerol 20%; SDS 4%; 2-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,02% e incubadas a 100°C durante 3 minutos. Após resfriamento aplicaram-se no gel quantidades entre 5 e 10 ug de proteínas.

#### Condições para a corrida

Utilizou-se tampão contendo tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1% com pH ajustado para 8,3 em ambas as cubas. A corrente aplicada no gel foi de 20 a 30 mA durante 4 a 6 horas em condições de temperatura ambiente.

#### Fixação e coloração das proteínas

Após a corrida o gel foi transferido para solução fixadora corante contendo cromassie blue R-250 0,25%; metanol 5 volumes (V); ácido acético glacial 1 V e água destilada 5 V. O gel foi mantido nesta solução durante 4 horas no mínimo.

#### Revelação das bandas Proteicas

O gel foi lavado com solução descorante contendo metanol, ácido acético glacial e água destilada na proporção (5:1:5), até completa remoção do corante. As bandas proteicas reveladas conservaram-se nítidas, mantendo-se o gel em ácido acético 7%.

### 5. PREPARAÇÃO DA LEGHB OXIGENADA

Utilizou-se o método descrito por Imamura e Riggs (1972), com modificações.

A solução de legHb oxidada, em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 foi reduzida pela adição de ditionito de sódio sólido na proporção de 2 mg/100 mg de legHb. A mistura legHb e redutor foi imediatamente aplicada a uma coluna de Sephadex G-25 previamente equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 6,8. A retenção do ditionito no topo da coluna, permite a oxigenação da legHb na própria coluna durante a eluição. A legHb oxigenada foi estável durante

uma semana a 4 °C, ou pode ser armazenada a - 20 °C por 30 dias sem que ocorra oxidação significativa.

## 6. PROPRIEDADES ÓPTICAS DA LEGHB

Os espectros de absorção da legHb na região visível entre (350-700 nm), foram determinados a 20 °C em um espectrofotômetro Varian acoplado a um registrador LKB.

O estado de oxidação da legHb ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) e o efeito de ligantes, foram analisados em função da variação espectral.

## 7. DETERMINAÇÃO DO pK DA TRANSIÇÃO ÁCIDA-ALCALINA DA LEGHB OXIDADA.

A legHb foi diluída em tampões 0,1 M com valores de pH entre 5,0 e 11,0 e a absorvância foi determinada em 575 nm. Os tipos de tampões utilizados foram: MES na faixa de pH entre 5,0 e 6,0; fosfato para pH 6,5 a 8,0; Tris HCl para pH 8,2 a 8,7; borato para pH entre 9,0 e 11,0. O método empregado para determinação do pK será apresentado em resultados.

## 8. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE AFINIDADE (K) DA LEGHB PELO ANION ACETATO.

Utilizou-se o método descrito por Appleby e colab. (1973), baseado na variação do espectro de absorção em função do aumento da concentração de acetato de sódio. A legHb foi diluída em tampão fosfato pH 6,8 contendo concentrações de acetato entre

0,025 M a 1 M e as absorvâncias foram determinadas em 530 e 620 nm. O cálculo da constante K, está indicado em resultados.

## RESULTADOS

### 1 - EFETIVIDADE DOS NÓDULOS DE MUCUNA PRETA EM FUNÇÃO DA ORIGEM DA ESTIRPE DE *RHIZOBIUM*.

As condições de cultivo de mucuna preta, adequadas para obtenção de nódulos efetivos contendo alto teor de legHb, foram estabelecidas testando-se inicialmente uma estirpe de *Rhizobium* selecionada para mucuna preta, utilizando-se como controle plantas noduladas por *Rhizobium* nativos presentes no solo utilizado.

A efetividade dos nódulos, foi avaliada pela determinação da concentração de legHb total (mg) em relação ao peso fresco dos nódulos (g). Assim a concentração máxima de legHb total (mg/g) de nódulos corresponderá à efetividade máxima dos nódulos.

Tabela 1: Comparação entre a nodulação de plantas inoculadas com *Rhizobium* selecionado estirpe SMS-601 e plantas não inoculadas. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação conforme métodos (1.2). A legHb foi parcialmente purificada a partir de 100 g de nódulos conforme métodos (2) e a concentração foi determinada pelo método (3.2). Os nódulos foram colhidos 2,5 meses após o plantio, quando as plantas estavam em estágio vegetativo.

	g de nódulos/ planta	mg de legHb/ g de nódulos
Lote 1: plantas inoculadas	2,1	0,33
Lote 2: plantas não inoculadas	4,7	0,85

Os resultados da tabela 1, indicando um aumento de 2,6 vezes no teor de legHb nos nódulos formados por *Rhizobium* nativos (lote 2), levou-nos a optar pelo cultivo de mucuna neste tipo de solo, mantendo-se os vasos em condições naturais e distanciados para evitar o sombreamento, devido ao rápido crescimento da mucuna preta durante a fase vegetativa.

## 2 - EFETIVIDADE DOS NÓDULOS NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DA MUCUNA PRETA

O segundo fator determinante da efetividade dos nódulos é a idade das plantas. Com esse objetivo a legHb foi purificada de nódulos colhidos no estágio vegetativo, na floração e na frutificação.

Tabela 2: Variação da Concentração da legHb em função do estágio de desenvolvimento das plantas. Os nódulos foram colhidos nas idades indicadas e 100 g de cada lote foi utilizada para a purificação e quantificação da legHb conforme métodos (2 e 3.2) respectivamente.

	idade (meses)	g de nódulos/planta	mg de legHb/ g de nódulos	Efeti- vidade
Vegetativo Lote:3	2,5	8,7	1,23	100%
Floração Lote:4	3,5	5,4	1,01	82%
Frutificação Lote:5	5	7,7	0,35	28%

O cultivo de mucuna em condições naturais, permitiu um aumento na síntese de legHb. Comparando-se o teor de legHb 0,85 mg do lote 2 (tabela 1) cultivado em casa de vegetação, com o valor de 1,23 mg obtido no lote 3 (tabela 2) cultivado em condições naturais tendo os dois lotes a mesma idade, verificamos um aumento de 0,38 mg de legHb/g de nódulo, correspondente a 31% de aumento da síntese nas plantas cultivadas em condições naturais.

### 3 - PURIFICAÇÃO DA LEGHB DOS NÓDULOS DE MUCUNA PRETA

A purificação da legHb conforme métodos 2, foi total após a primeira etapa cromatográfica (DEAE-celulose equilibrada com fosfato pH 7,0) com a qual foram eliminados os pigmentos nodulares. Nas etapas anteriores, a quantificação da legHb e de proteínas totais não foi possível devido à interferência dos pigmentos que dão ao extrato de tecido nodular uma coloração marrom escura. Nas etapas subsequentes foi avaliado o teor de legHb recuperado em relação à quantidade inicial obtida dos nódulos após eliminação dos pigmentos. Na última etapa, os componentes separados foram somados para obtenção do rendimento final da purificação.

Os resultados relativos ao rendimento final de uma purificação estão sumarizados na tabela 3 :

Tabela 3: Rendimento da purificação de legHb a partir de 217 g de de nódulos de mucuna preta em estágio de floração. A purificação foi feita conforme métodos (2) e a quantificação da legHb refere-se a mg totais obtidas após cada tipo de cromatografia.

	mg totais de legHb	Rendimento %
DEAE-Cel. equil. com fosfato pH 7,0	220	100
Sephadex G-25 equil. com acetato pH 5,2	163	74
DEAE-Cel. equil. com acetato pH 5,2	138	63

O rendimento final de 63% representa a soma dos componentes após separação em relação a quantidade inicial de legHb considerada 100%. A utilização de plantas no estágio de floração para avaliar o rendimento, foi devido ao fato de termos uma maior quantidade de plantas neste estágio e conseqüentemente uma maior quantidade de legHb. O rendimento das purificações efetuadas de nódulos no estágio vegetativo ou na frutificação oscilou entre 60% e 65%.

#### 4. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DA LEGHB TOTAL NO ESTÁDIO VEGETATIVO OU NA FLORAÇÃO.

O perfil cromatográfico dos componentes da legHb purificada de nódulos em estágio de floração indicado na fig.1, pode ser sobreposto ao perfil cromatográfico dos componentes da legHb purificada de nódulos em estágio vegetativo tanto em relação ao número de componentes, como quanto à quantidade relativa de cada um nestes estádios de desenvolvimento. Por esta razão, está sendo indicado apenas uma das cromatografias referentes a estes estádios. A separação da legHb total em 5 componentes, sendo os tres primeiros eluídos na mesma força iônica por lavagem da coluna com tampão acetato 10 mM pH 5,2, foi baseada na velocidade diferencial com que foram eluídos e estão identificados na figura como I, II e III. Os componentes IV e V, ligam-se fortemente à resina e foram eluídos por aumento da força iônica do acetato através de um gradiente linear entre 10 e 100 mM. O componente IV foi eluído entre 25 e 35 mM e o V entre 50 e 70 mM. A força iônica estabelecida de maneira aproximada pelo gradiente, foi melhor definida pela aplicação de tampão acetato na concentração de 30 mM para o componente IV e 60 mM para o componente V.

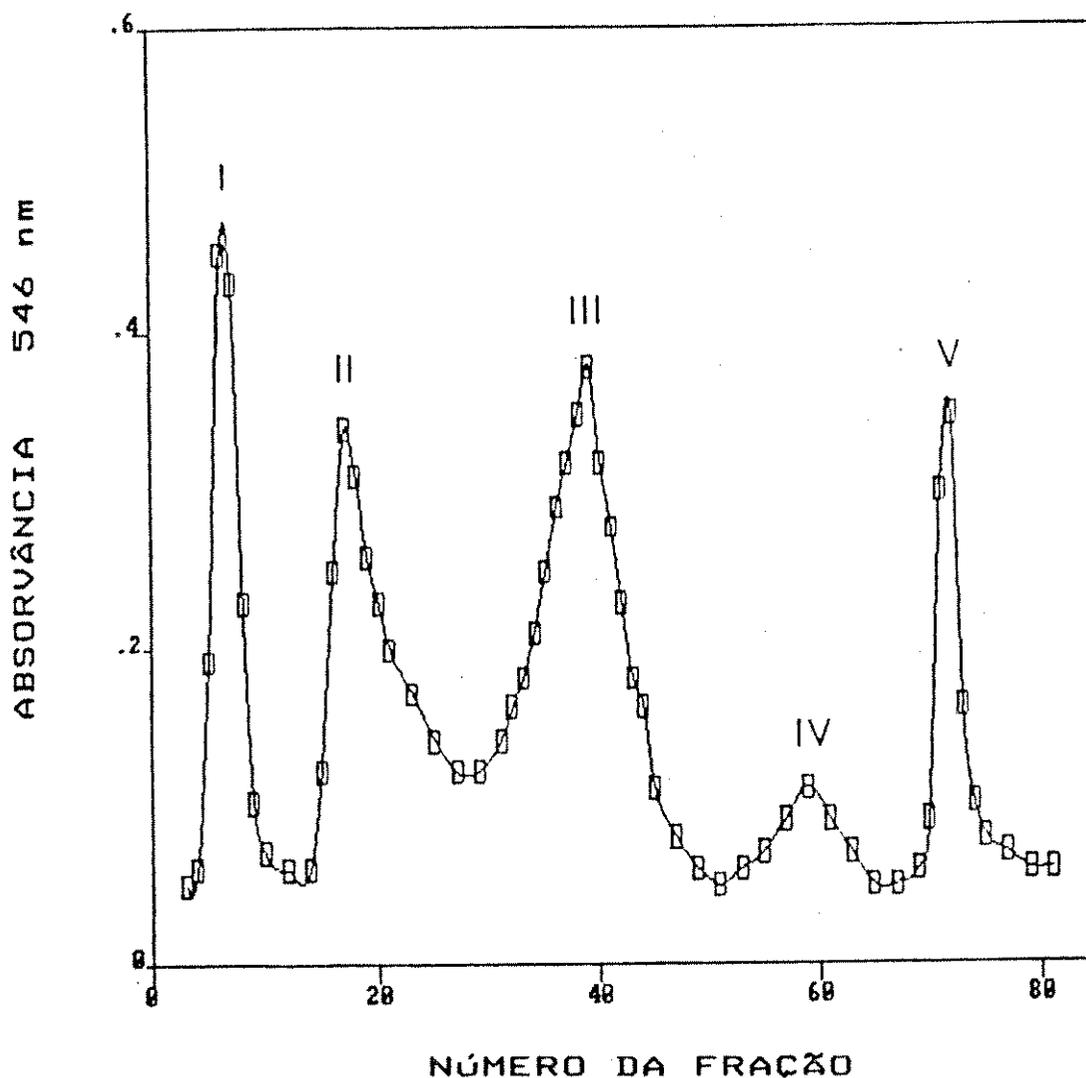


Figura 1: Separação dos componentes da legHb total durante a FLORAÇÃO por cromatografia em DEAE-celulose.

163 mg de legHb total foram aplicadas em uma coluna de DEAE-celulose (2,5 x 15cm) equilibrada com tampão acetato 10 mM pH 5,2. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até serem eluídos os componentes I, II e III. A partir da fração 42 aplicou-se um gradiente linear de tampão acetato pH 5,2 contendo 200ml de tampão 10 mM e 200ml de tampão 100 mM, eluindo-se os componentes IV e V. A eluição da legHb foi seguida pela leitura da ABS. em 546 nm e o volume de cada fração foi de 8 ml.

## 5 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS COMPONENTES EM RELAÇÃO À LEGHB TOTAL DURANTE A FLORAÇÃO.

Os tubos correspondentes a cada componente, eluídos conforme a figura 1 foram reunidos e concentrados para determinação do teor de legHb que cada componente representa em relação a legHb total aplicada na coluna. Os valores obtidos estão indicados na tabela 4.

Tabela 4: Quantificação dos componentes separados conforme fig.1. A proporção relativa de cada um (mg totais) foi calculada em relação à quantidade de legHb total aplicada na coluna que foi 163 mg e equivalente 100%. A recuperação da legHb na forma de componentes foi de 138 mg que corresponde a 85%.

	I	II	III	IV	V
mg totais de cada compon.	24,2	36,3	56,6	3,4	17,3
% em relação à legHb total	14,8	22,3	34,7	2,1	10,6

Na floração ou no estágio vegetativo o componente III que foi eluído em maior quantidade que os demais corresponde a cerca de 35% da legHb total aplicada na coluna e o componente IV que foi eluído em menor quantidade representa 2% da legHb total (tabela 4).

## 6 - SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DA LEGHB DE NÓDULOS DE PLANTAS EM FRUTIFICAÇÃO.

Comparando-se o perfil cromatográfico da fig. 2 com a fig. 1 nota-se que na frutificação (fig. 2) são encontrados apenas 4 componentes. A numeração destes componentes, I; III; IV e V, foi baseada na semelhança com que foram eluídos em relação à fig. 1. Os componentes I e III, eluídos na mesma força iônica, durante a lavagem da coluna com tampão acetato 10 mM pH 5,2, foram correlacionados com a fig. 1 em função do volume de eluição. No volume de eluição correspondente ao componente II, não foi constatada a presença de legHb, embora o eluído tenha sido analisado pela Abs em 405 nm que aumenta a sensibilidade para detecção da legHb em 20 vezes sendo este comprimento de onda mais adequado para amostras diluídas. Os componentes IV e V, foram eluídos por gradiente linear de força iônica da mesma maneira que estes componentes foram eluídos na fig. 1. O componente IV foi eluído em 30 mM de acetato e o V em 60 mM.

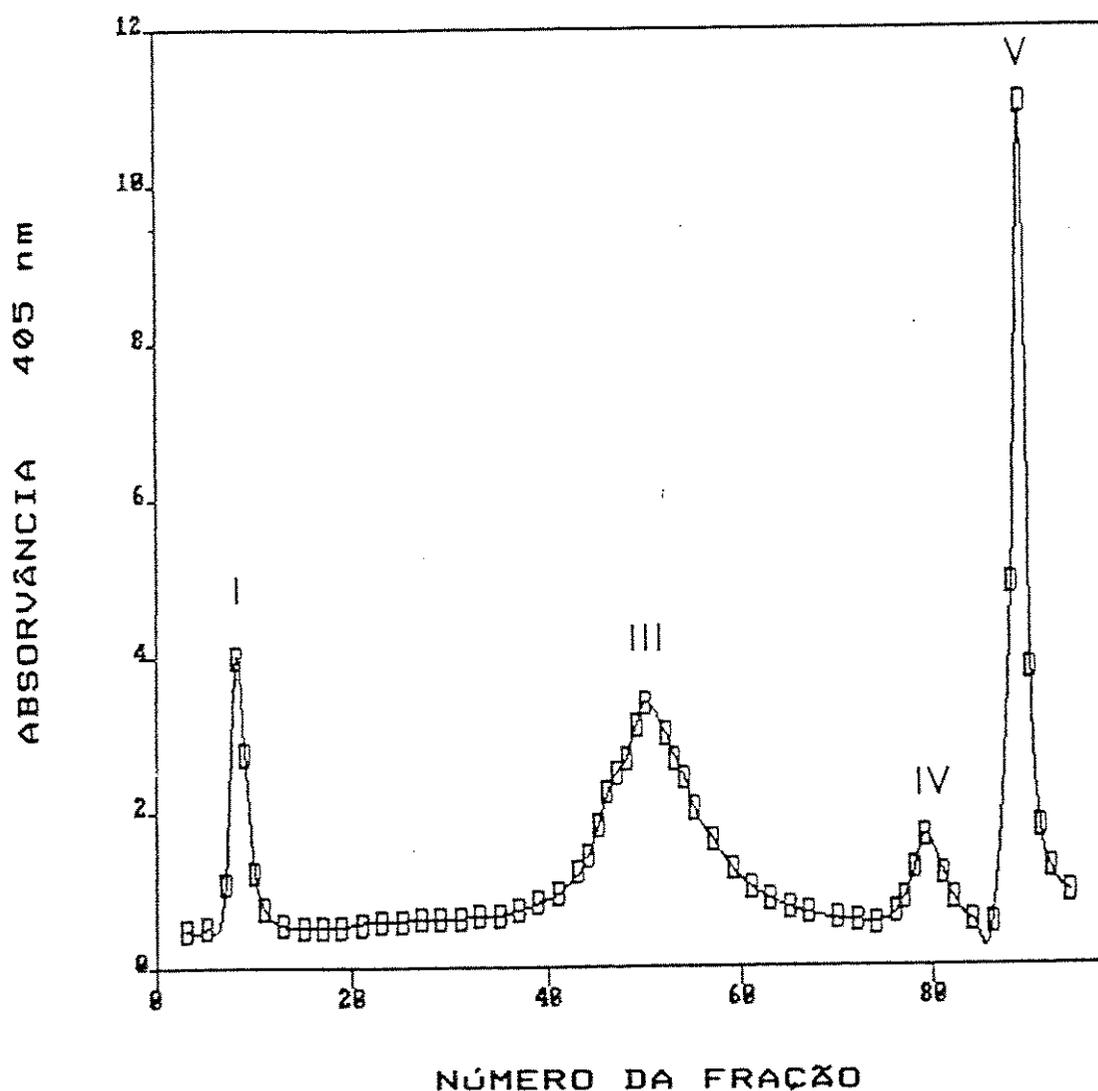


Figura 2: Separação dos componentes da legHb total durante a FRUTIFICAÇÃO por cromatografia em DEAE-celulose.

58 mg de legHb total foram aplicadas em uma coluna de DEAE-celulose (2,2 x 12cm). Após eluição dos componentes I e III com tampão acetato 10 mM pH 5,2, aplicou-se um gradiente linear composto de 100 ml de acetato 10 mM e 100 ml de acetato 100 mM ambos pH 5,2 a partir da fração 61, eluindo-se os componentes IV e V por aumento da força iônica. Foram coletadas frações de 5 ml e a eluição da legHb foi seguida por leitura direta da ABS. a 405 nm.

7 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS COMPONENTES EM RELAÇÃO À LEGHB TOTAL DURANTE A FRUTIFICAÇÃO.

Os componentes obtidos pela cromatografia da legHb total (figura 2) purificada de nódulos em frutificação, foram concentrados para determinação do teor de legHb que cada componente representa em relação à legHb bruta. Os resultados estão indicados na tabela 5.

Tabela 5 : Quantificação dos componentes separados conforme figura 2. A concentração relativa de cada componente foi calculada, considerando-se a quantidade de legHb total 58 mg colocada na coluna como 100%. Após separação dos componentes foram recuperadas 41,3 mg que correspondem a 71,2%.

	I	III	IV	V
mg totais de cada compon.	4,5	20,2	2,9	13,7
% em relação à legHb total	7,8	34,8	5,0	23,6

Na frutificação o componente III também representa o principal tipo de componente em quantidade relativa e corresponde a cerca de 35% da legHb total aplicada na coluna e o componente IV neste estágio foi eluído em menor quantidade sendo 5% da legHb total (tabela 5).

8 - VARIACÃO QUANTITATIVA DOS COMPONENTES EM FUNÇÃO DO ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO.

A quantidade relativa de cada componente nos diferentes estádios de desenvolvimento é mais facilmente visualizada na tabela 6 na qual apenas os valores percentuais estão indicados.

Tabela 6: Os resultados obtidos na tab.4 e 5, referentes à concentração dos componentes na floração e frutificação respectivamente, foram reunidos para uma análise comparativa.

% em relação à legHb total		
	FLORAÇÃO	FRUTIFICAÇÃO
I	14,8	7,8
II	22,3	
III	34,7	34,8
IV	2,1	5,0
V	10,6	23,6

O componente III em ambos os estádios é o principal em quantidade relativa (35%). O componente II, não detectado na frutificação, é o componente secundário na floração e corresponde a 22% da legHb total. Os componentes IV e V que na floração são encontrados em menores quantidades que os demais, na frutificação têm suas quantidades relativas aumentadas.

9 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% CONTENDO SDS (SDS-PAGE) DA LEGHB TOTAL E DOS COMPONENTES.

A SDS-PAGE conforme descrito em métodos 4 foi empregada visando determinar o grau de purificação da legHb e também o PM.

O grau de purificação da legHb total após eliminação dos pigmentos nodulares e dos respectivos componentes separados conforme fig.1, analisado por SDS-PAGE mostrou ausência de proteínas contaminantes exceto uma banda difusa com PM em torno de 29000 no componente V conforme pode ser observado na fig.3. Embora nesta concentração de gel as legHb migram muito próximas da linha de frente, sendo esta uma das causas das distorções as bandas são nítidas e facilitam a observação de contaminantes. O uso da mioglobina como marcador serviu de referência para padronização das condições para determinação do PM da legHb.

10 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 17,5% DE MARCADORES DE BAIXO PESO MOLECULAR.

A corrida eletroforética de marcadores de PM na faixa entre 14200 a 45000 visou determinar a concentração de gel adequada para determinação do PM da legHb. A fig.4 mostrando a migração destes marcadores em gel 17,5%, indica que a mioglobina tem uma resolução melhor nesta concentração de gel, situando-se menos próxima da linha de frente em comparação com sua migração em gel 15% (fig.3). A migração destes marcadores foram utilizados na construção da curva padrão de PM (fig.4.1).

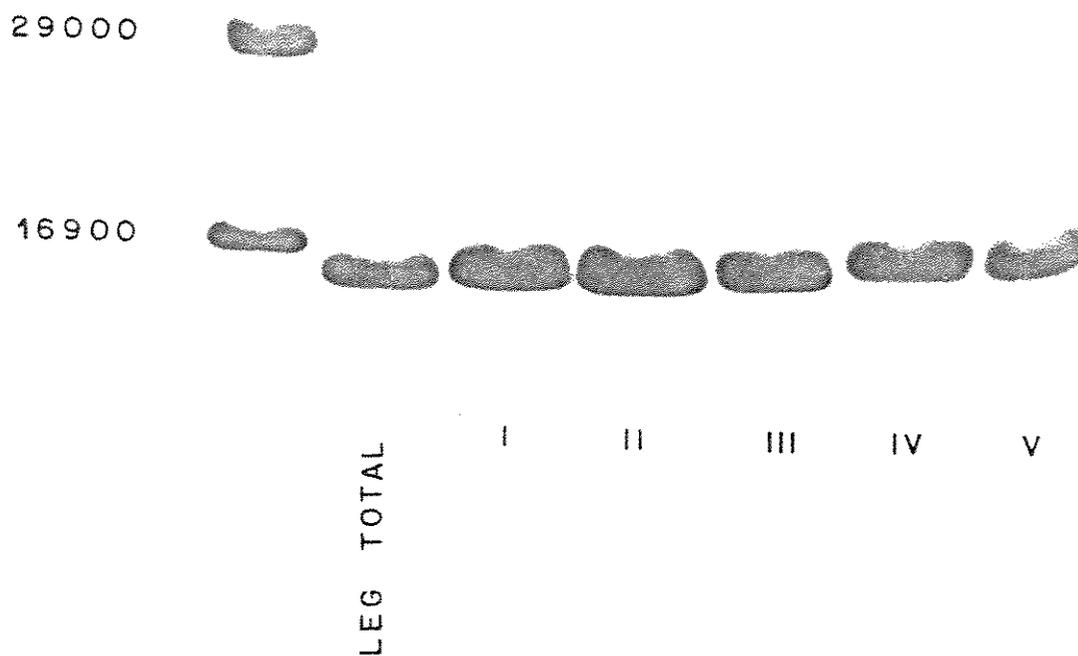


Figura 3: SDS-PAGE em gel 15% da legHb total e dos respectivos componentes.

Aplicou-se no gel 5  $\mu$ g de cada amostra indicada na figura. A legHb total é proveniente da cromatografia em DEAE para eliminação dos pigmentos. Os componentes I; II; III; IV e V correspondem ao fracionamento da legHb total por cromatografia em DEAE-acetato conforme fig.1. Os marcadores de PM correspondem a mioglobina de cavalo (16900) e anidrase carbonica (29000).

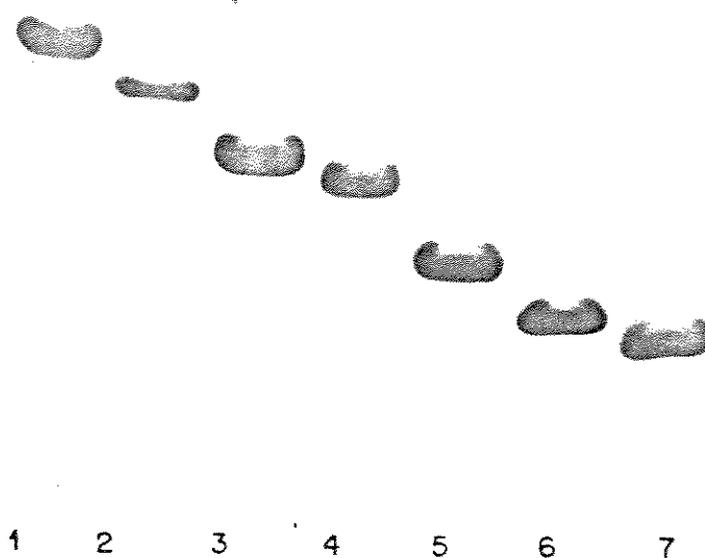


Figura 4: SDS-PAGE em gel 17,5% de marcadores de PM entre 14200 e 45000.

5 ug de cada padrão de peso molecular foram aplicadas no gel na seguinte sequência: 1: ovoalbumina (45000); 2: gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (36000); 3: anidrase carbonica (29000); 4: tripsinogênio (24000); 5: inibidor de tripsina (20100); 6: mioglobina de cavalo (16900) e 7:  $\alpha$  lactoalbumina (14200).

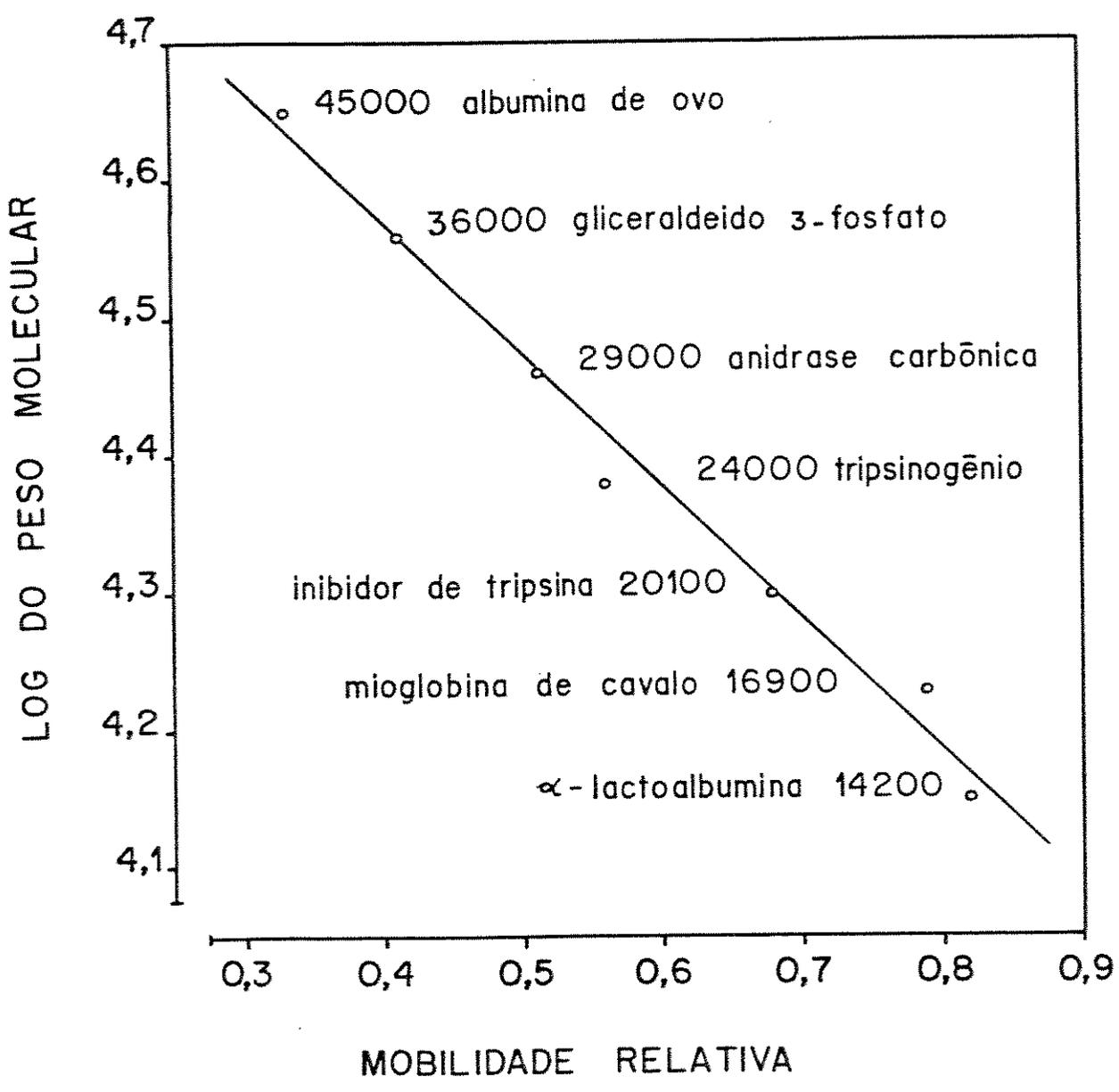


Figura 4.1: Curva Padrão de Peso Molecular.

A migração relativa (cm) das proteínas marcadoras de PM indicadas na fig.4, foi utilizada na construção da curva. A reta foi obtida por regressão linear.

Uma análise conjunta da fig.4 e 4.1, mostra um comportamento anômalo do tripsinogênio (amostra 4 fig.4, PM 24000). Este marcador teve uma migração menor do que a correspondente ao seu peso, conforme pode ser observado na curva (fig.4.1). Com relação aos marcadores com PM menor que a mioglobina,  $\alpha$  lactoalbumina - 14200 e citocromo c - 12300 (não mostrado na figura), não foi possível obter migração diferencial entre estes dois marcadores. O aumento da concentração do gel para 20%, não mudou o comportamento destes marcadores, além de provocar dispersão das bandas (resultados não mostrados).

#### 11 - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA LEGHB E DOS COMPONENTES EM SDS-PAGE 17,5%

A determinação do PM da legHb em gel 17,5%, foi escolhida em função da maior distância entre as amostras e a linha de frente, diminuindo-se as distorções. A fig.5 mostrando a migração da legHb e dos componentes, forneceu um PM de 14600 para a legHb total e para os componentes IV e V. Uma pequena diferença de PM foi constatada para os componentes I, II e III, cujo o valor obtido foi 15000. Esta pequena variação de PM não será considerada uma vez que nesta faixa de PM esta metodologia é limitada conforme observado durante a padronização fig.4. Assumimos que o PM mais provável é 14800 o qual é resultante da média dos pesos obtidos.

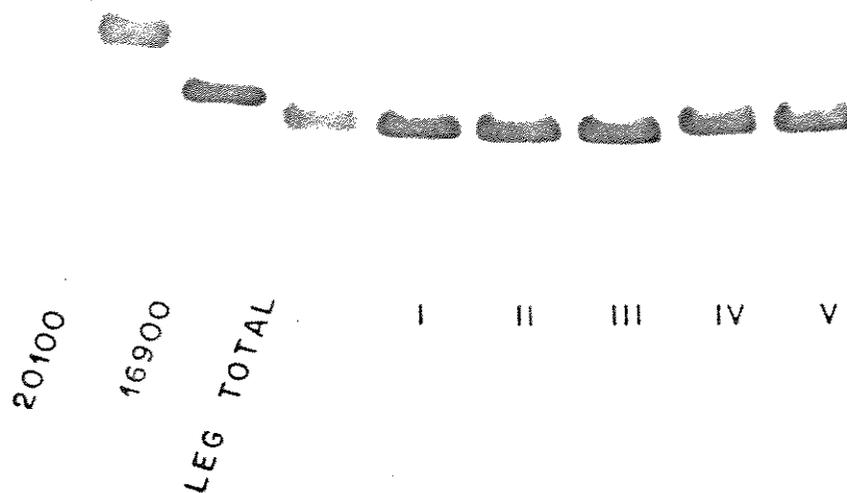


Figura 5: ELETROFORESE DA LEGHB TOTAL E DOS COMPONENTES EM GEL 17,5% (SDS-PAGE)

As amostras de legHb aplicadas no gel, são as mesmas utilizadas na fig.3. Os marcadores de PM são inibidor de tripsina-20100 e mioglobina de cavalo-16900. 5 ug de cada amostra foi aplicada no gel.

12 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA LEGHB OXIGENADA NA REGIÃO VISÍVEL ENTRE 350-650 nm.

A forma oxigenada da legHb preparada conforme métodos 5, tanto do componentes I quanto do componente V, que são os mais diferenciados quanto à força iônica necessária para eluição, 10 e 60 mM respectivamente (fig.1), não apresentaram qualquer variação com relação ao espectro de absorção (fig.6). Na região 500-650 nm a absorção máxima ocorre em 540 e 574 nm com pequena diferença de intensidade. Na região 350-450 nm um único pico foi observado em 411 nm (banda Soret).

13 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA LEGHB REDUZIDA NA REGIÃO VISÍVEL ENTRE 350-650 nm.

A forma reduzida da legHb ( $Fe^{2+}$ ), também não apresentou diferenças espectrais entre os componentes I e V e está representada na fig.7. Na região entre 500-650 nm apenas um pico de absorção máximo ocorre em 557 nm. Na região 350-450 nm a absorção máxima da banda do Soret ocorreu em 427 nm.

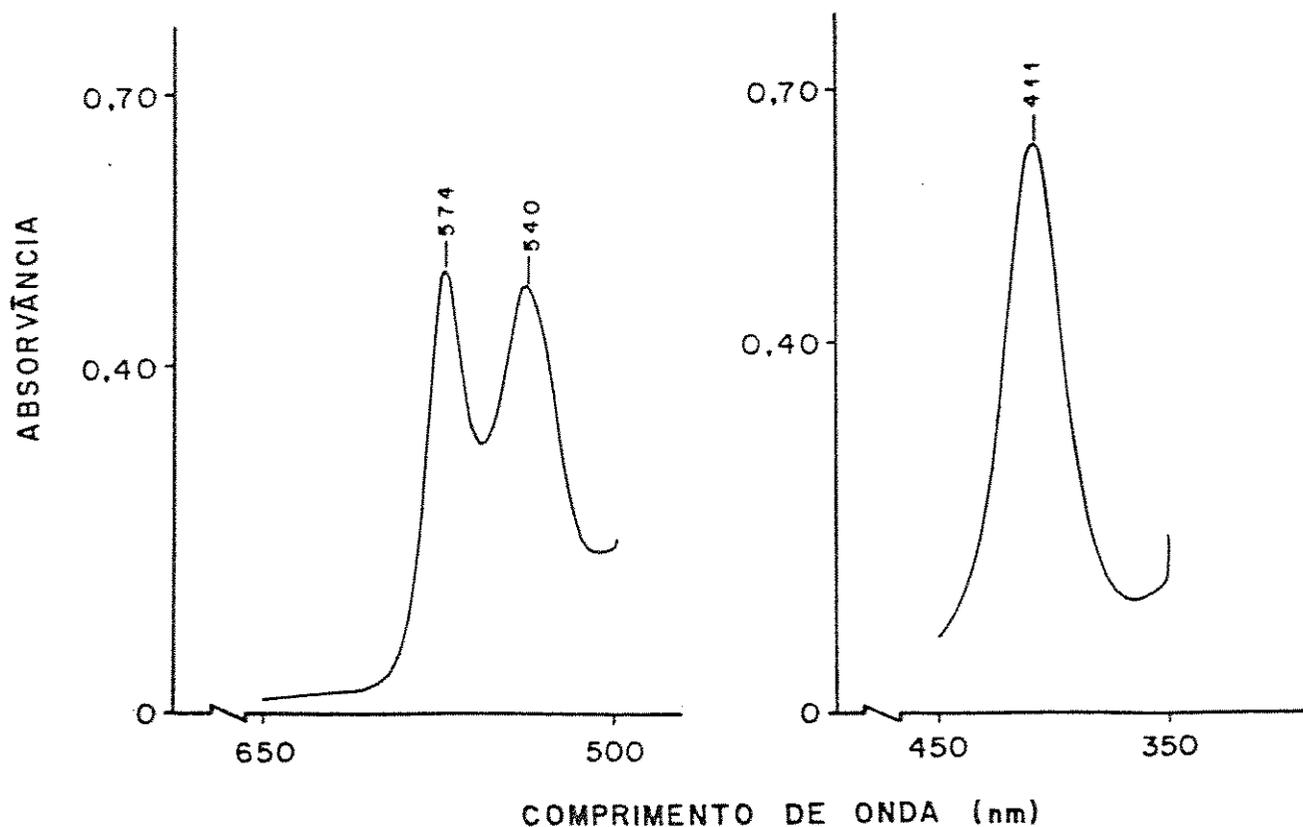


Figura 6: Espectro de absorção da legHb oxigenada na região visível (350-650 nm).

A legHb foi oxigenada conforme descrito em métodos (5). A concentração da oxi-legHb na região entre (500-650 nm) foi 54  $\mu\text{M}$  e na região do Soret (350-450 nm) 5,4  $\mu\text{M}$ . As amostras foram diluídas em tampão fosfato 0,1M pH 6,8 nos dois casos. Os comprimentos de onda correspondentes à absorção máxima foram 411; 540 e 574 nm, conforme indicado na figura.

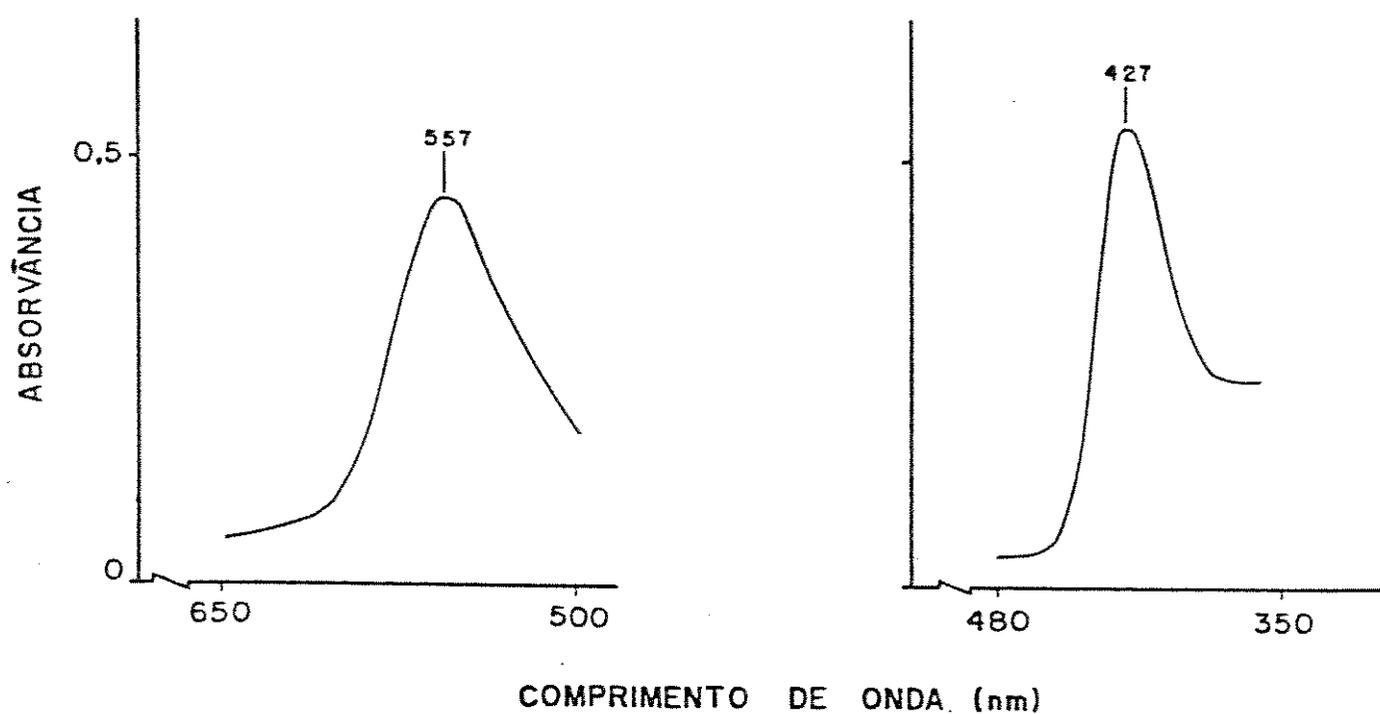


Figura 7: Espectro de absorção da legHb reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na região visível (350-650 nm)

As amostras oxigenadas utilizadas no espectro da fig.6 foram reduzidas pela adição de ditonito de sódio sólido 1 mg/ml e os espectros foram determinados imediatamente. A absorção máxima da legHb reduzida ocorreu em 427 e 557 nm.

#### 14 - INFLUÊNCIA DO pH NO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA LEGHB OXIDADA NA REGIÃO ENTRE 500-700 nm

A forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que é a forma dos componentes após separação, foi analisada em relação ao efeito do pH no espectro de absorção. Tanto o componente I quanto o componente V foram estudados, visando estabelecer diferenças uma vez que os espectros das formas oxigenada e reduzida fig.6 e 7 respectivamente, não apresentam qualquer diferença.

A fig.8 mostra a variação no espectro de absorção em função do pH. Na região ácida pH maior ou igual a 5,3 e menor que 7,0, praticamente não ocorre variação no espectro, enquanto a partir de pH 7,5 a absorvância aumenta gradualmente até pH 10,5. Valores de pH maior que 10,5 não induzem a aumento da absorvância. A fig.9 mostrando apenas o espectro dos valores extremos de pH, permite uma melhor visualização das formas ácida e alcalina. Os picos de absorção da forma ácida pH 5,3, situam-se em 530 e 625 nm. A forma alcalina pH 10,5, possui absorção máxima em 543 e 575 nm.

#### 15 - INFLUÊNCIA DO pH NA REGIÃO ENTRE 350-450 nm.

O efeito do pH nesta região é contrário ao observado na fig.8, ou seja os valores da absorvância diminuem com o aumento do pH (fig.10). Em pH 5,3 a absorção é máxima e ocorre em 404 nm, enquanto que em pH 10,5 onde ocorre o menor valor de absorvância, o pico foi deslocado para 411 nm (fig.11).

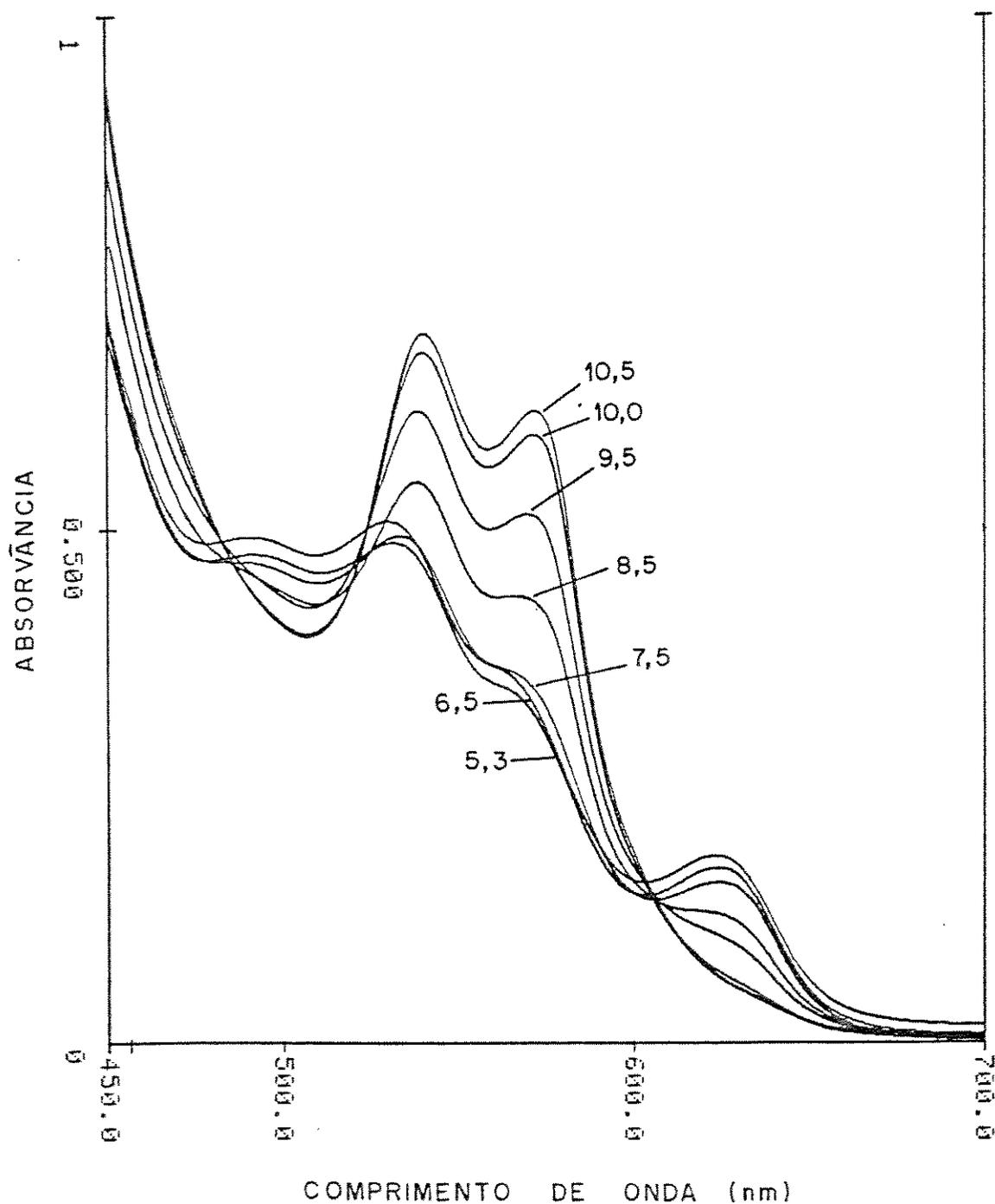


Figura 8: Efeito do pH no espectro de absorção da legHb oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na região visível (450-700 nm).

O componente I, separado conforme fig.1 foi diluído para 70  $\mu\text{M}$  nos seguintes tampões: MES pH 5,3; fosfato pH 6,5 e 7,5; Tris-HCl pH 8,5; borato pH 9,5 e 10,5. A concentração de todos os tampões foi 0,1 M. Nos espectros em pH maior que 5,3 e menor que 7,0, houve sobreposição das curvas. O aumento da abs. em função do aumento do pH se estabiliza em pH 10,5.

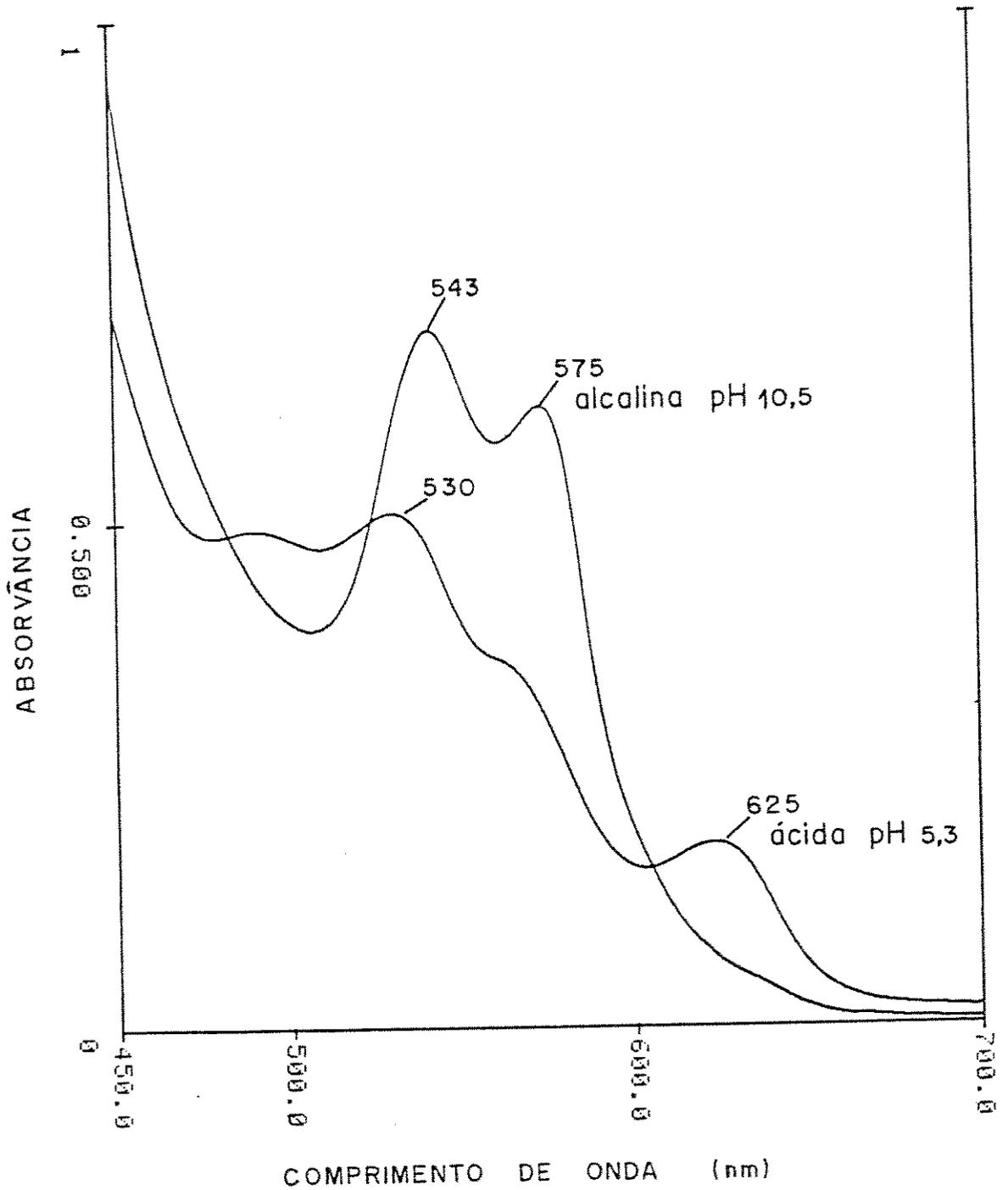


Figura 9: Espectro de absorção da forma ácida e da forma alcalina da legHb oxidada na região (450-700 nm).

A mudança no espectro de absorção durante a transição da forma ácida pH 5,3 para a forma alcalina pH 10,5 é mais intensa na região entre 530-580 nm, onde a forma alcalina tem absorção máxima. As amostras utilizadas são as mesmas da fig.8.

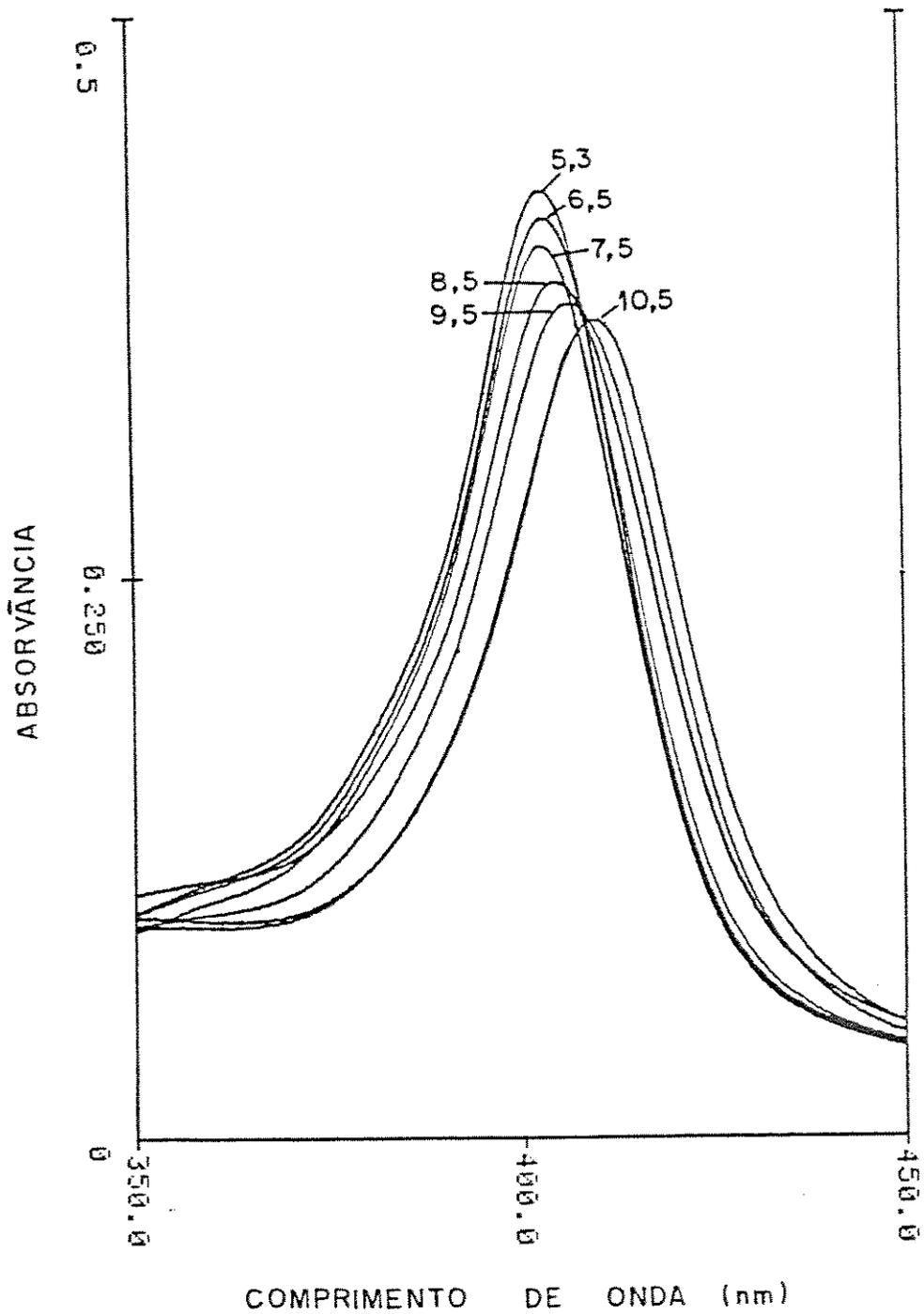


Figura 10: Efeito do pH no espectro de absorção da legHb (Fe<sup>3+</sup>) na região visível (350-450 nm).

As amostras utilizadas na fig.8 , foram diluídas para 3,5 uM nos mesmos tampões. Na região do Soret a absorvância aumenta com a acidez, sendo máxima em pH 5,3 e mínima em pH 10,5.

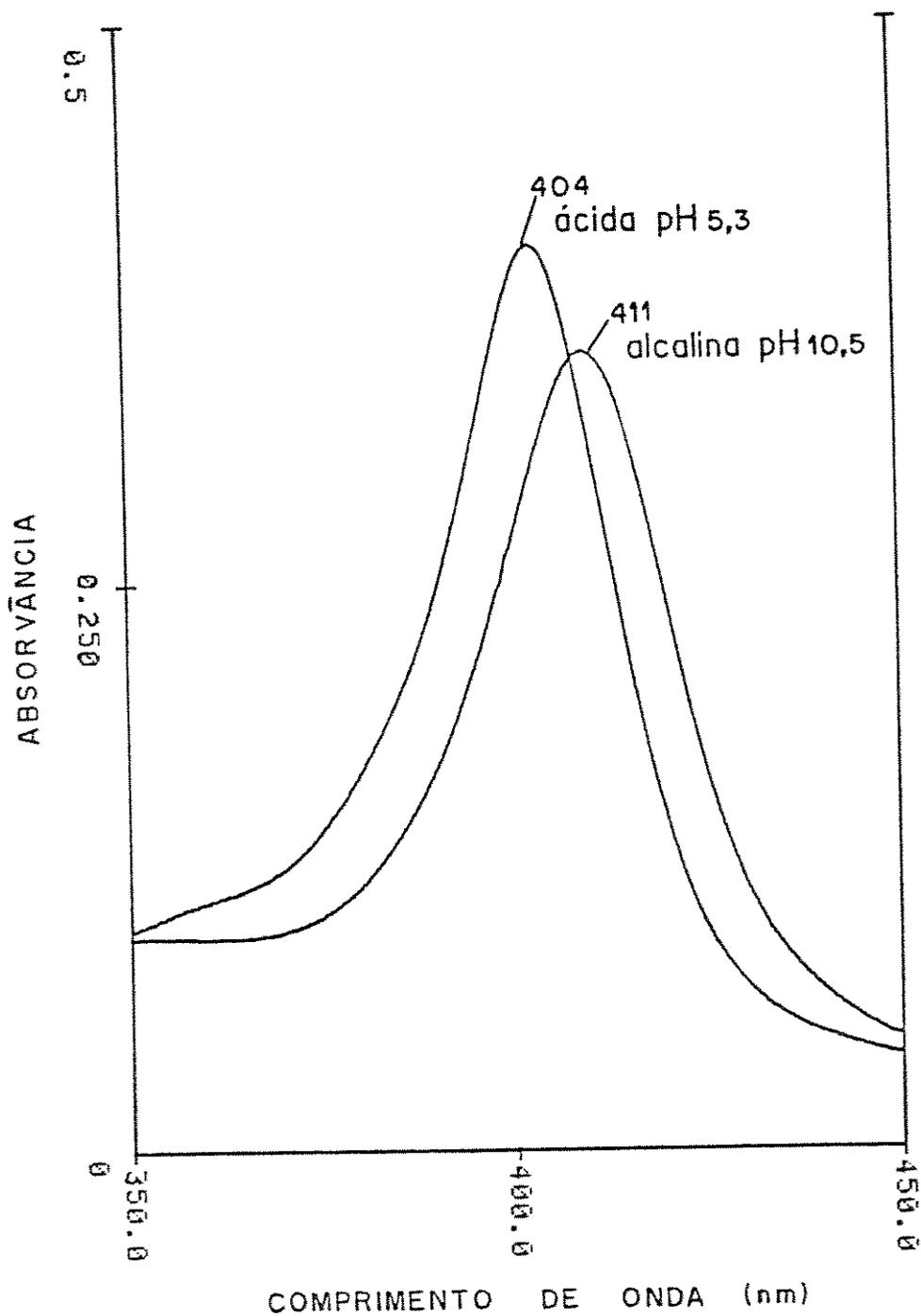


Figura 11: Espectro de absorção da forma ácida e da forma alcalina da legHb ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na região visível (350-450 nm).

O pico de absorção máxima da forma ácida pH 5,3 em 404 nm sofre um deslocamento acompanhado de redução da absorvância para 411 nm durante a transição para a forma alcalina pH 10,5. Utilizou-se as mesmas amostras da fig.10 .

## 16 - TRANSIÇÃO ÁCIDA-ALCALINA DA LEGHB.

A forma ácida das legHb possuem como ligante da 6ª posição de coordenação do átomo de  $Fe^{3+}$ , uma molécula de  $H_2O$ , podendo ser representada por  $legHb.H_2O$ . O aumento do pH, causa a dissociação de um proton da molécula de  $H_2O$  levando à formação da forma alcalina  $legHb.OH$  (Ellfolk, 1961 b).

O aumento gradual da absorvância, em função do aumento do pH na região 500-700 nm é consequência da relação entre estas duas formas (fig.8). A região do espectro onde a variação da Abs. é máxima foi em 575 nm (fig.9), sendo este comprimento de onda escolhido para a leitura da Abs. em intervalos menores de pH. A medida da dissociação da legHb em função do pH, permite a construção da curva de titulação da transição ácida-alcalina da legHb.

O grau de dissociação da legHb definido por  $\alpha$ , é medido de acordo com a expressão:

$$\alpha = \frac{A_{pH_{obs.}} - A_{pH_{ac.}}}{A_{pH_{alc.}} - A_{pH_{ac.}}}$$

onde:  $A_{pH_{obs.}}$  significa a absorvância lida em cada pH.

$A_{pH_{ac.}}$  Absorvância mínima em pH ácido

$A_{pH_{alc.}}$  Absorvância máxima em pH alcalino

Como pH ácido e pH alcalino, foram considerados os valores 5,3 e 10,5 respectivamente que correspondem as formas não dissociada ( $legHb.H_2O$ ), cuja Abs. é mínima, e à forma totalmente dissociada ( $legHb.OH$ ) que possui Abs. máxima.

A curva de titulação do componente I, mostrando a transição ácida-alcalina está indicada na fig.12.

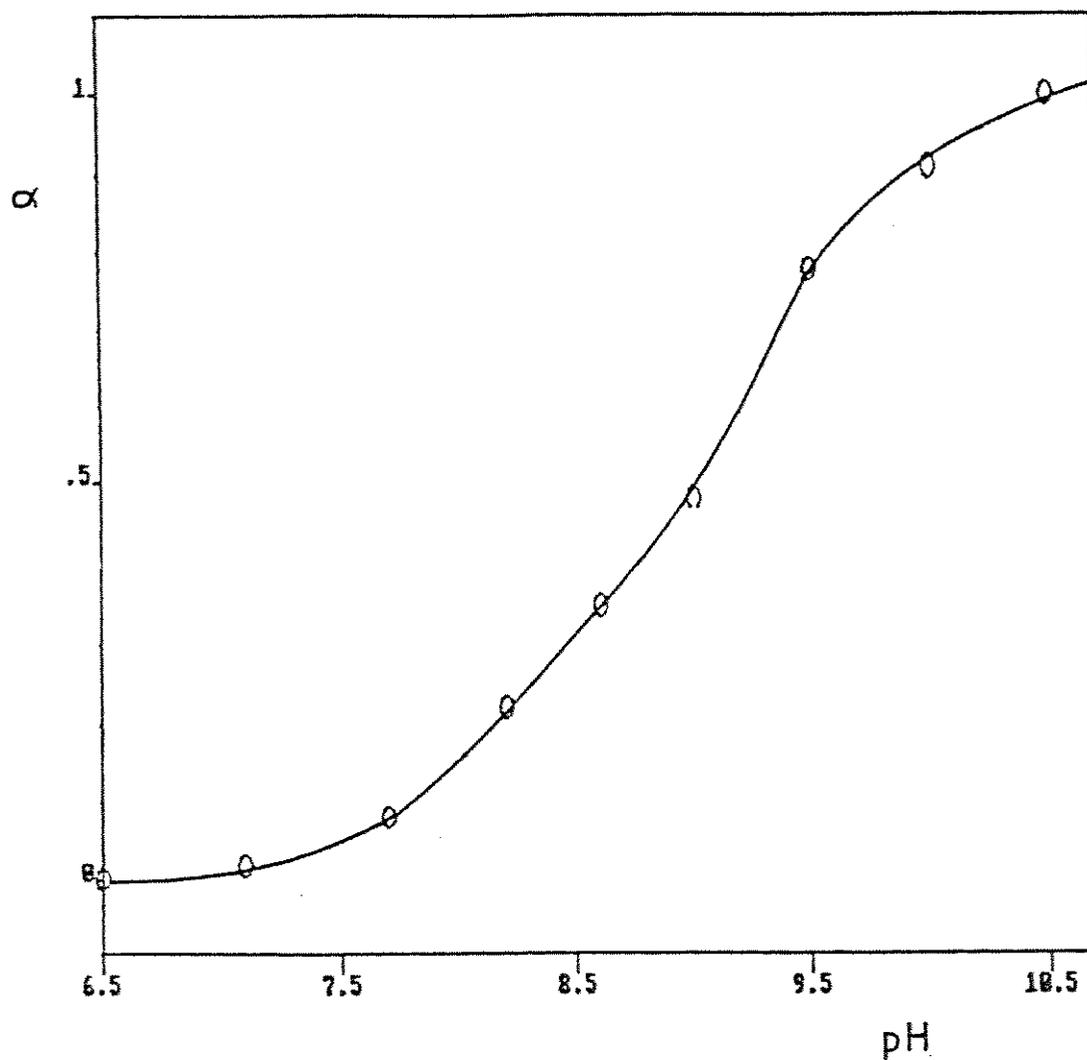


Figura 12: Curva de titulação do Componente I oxidado.

As amostras foram diluídas para 62  $\mu$ m nos seguintes tampões 0,1 M: fosfato pH 6,5 e 7,1; Tris-HCl pH 8,2 e 8,6; borato pH 9,0; 9,5; 10,0 e 10,5 e a abs. foi determinada em 575 nm. O parâmetro  $\alpha$  representa o grau de dissociação conforme definido no texto.

17 - DETERMINAÇÃO DO pK DA TRANSIÇÃO ÁCIDA-ALCALINA DO COMPONENTE I.

A utilização dos valores obtidos na curva de titulação (fig.12), permitiu a determinação do valor do pK desta transição, conforme indicado na fig.13 que é definido como o valor de pH onde  $[legHb.H_2O]=[legHb.OH]$ . O ponto de intersecção da reta que satisfaz esta igualdade resultou em  $pK=8,92$ .

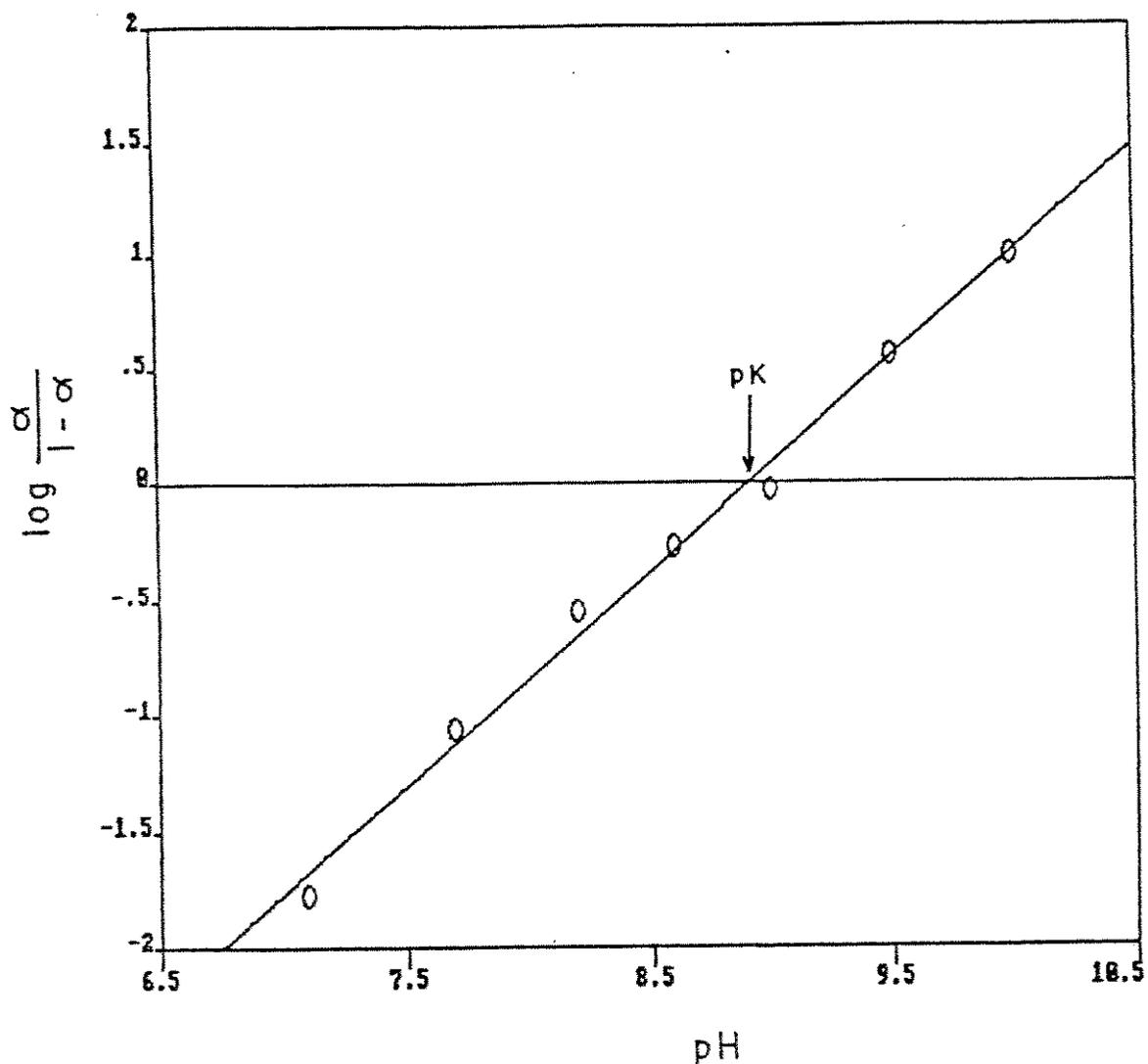


Figura 13: Determinação gráfica do pK da transição ácida-alcalina do componente I oxidado.

Os resultados obtidos na fig.12 foram utilizados para determinação gráfica do pK.-A reta foi determinada por regressão linear e o valor do pK foi 8,92.

18 - DETERMINAÇÃO DO pK DA TRANSIÇÃO ÁCIDA-ALCALINA DO COMPONENTE V.

A curva de titulação do componente V (fig.14) e o pK da transição ácida-alcalina (fig.15), foi determinado nas mesmas condições empregadas para o componente I e o valor de pK para este componente foi 9,01.

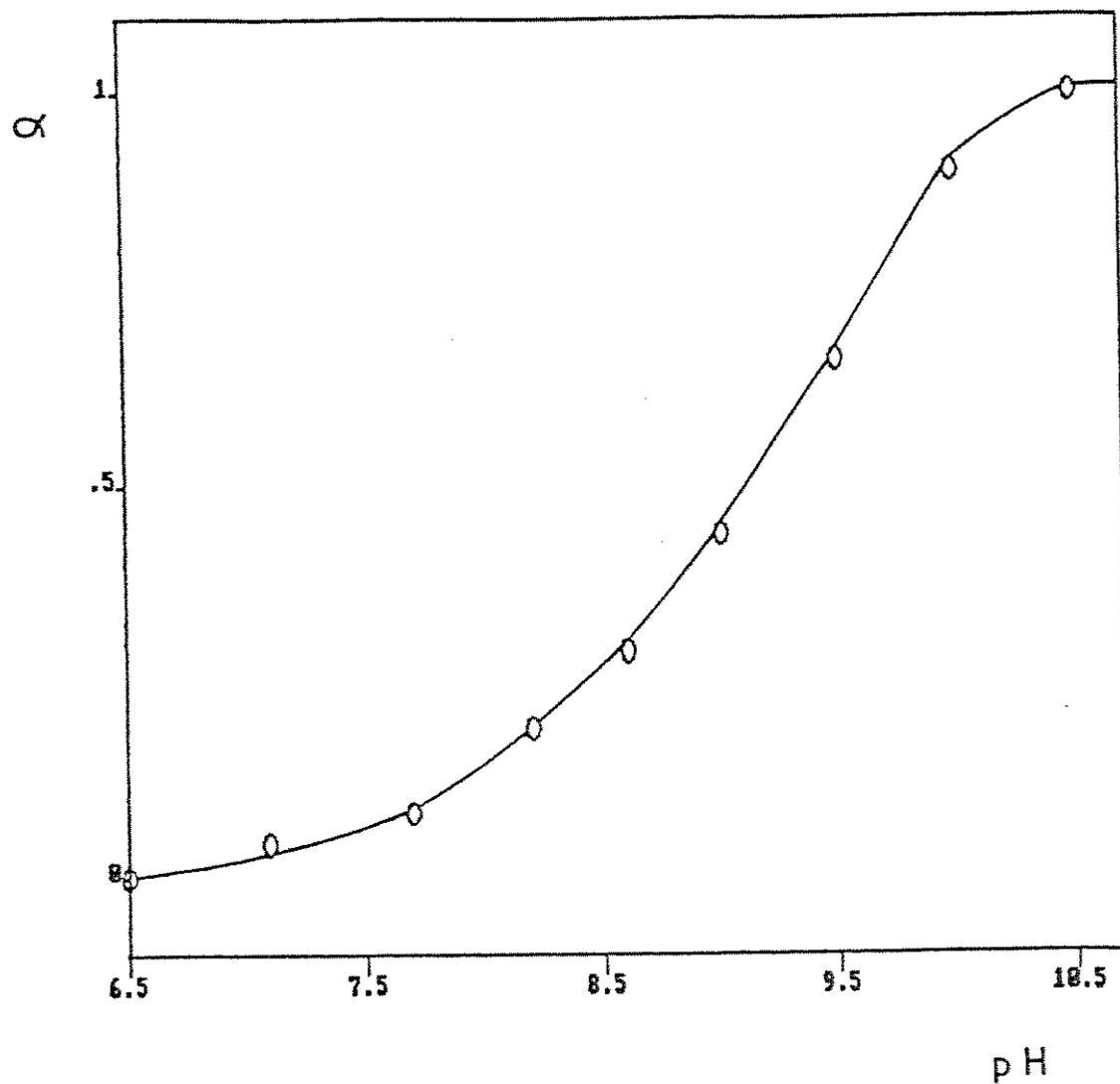


Figura 14: Curva de titulação do componente V oxidado.

As condições experimentais foram as mesmas empregadas para a fig.12 exceto em relação a concentração da legHb que foi de 74  $\mu\text{M}$ .

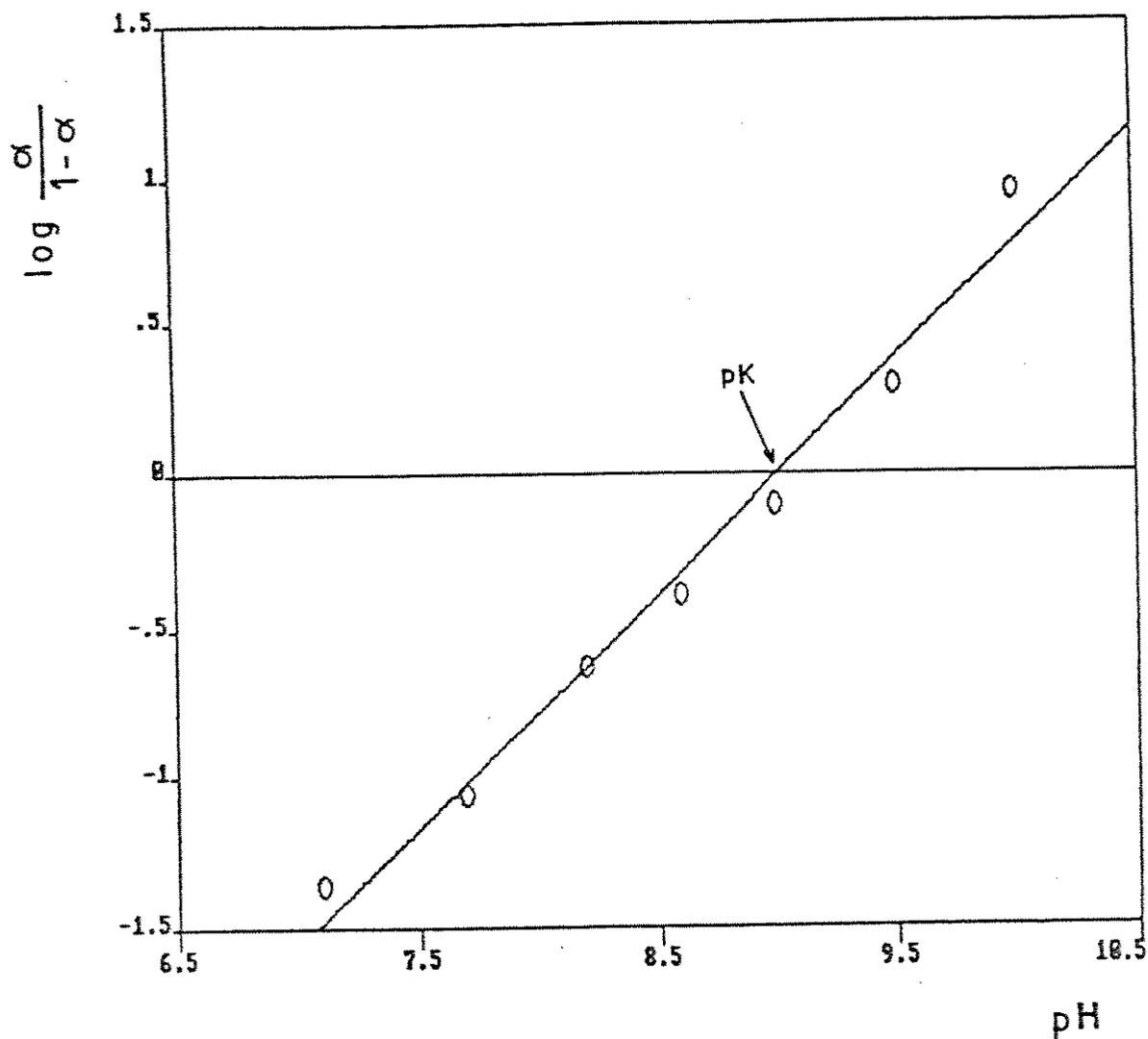


Figura 15: Determinação do pK da transição ácida-alcalina do componente V oxidado.

Os valores obtidos pela curva de titulação fig.14, forneceram um valor de pK igual a 9.01. A reta foi obtida por regressão linear.

## 19 - COMBINAÇÃO DA LEGHB OXIDADA COM O ANION ACETATO

O anion acetato de liga-se reversivelmente à legHb ( $\text{Fe}^{3+}$ ), formando um complexo de coloração verde clara cuja intensidade é dependente da concentração de acetato e pode ser medida pela variação do espectro de absorção na região entre 500-700 nm. As concentrações de acetato na faixa de 0.025M a 1 M são os limites mínimo e máximo respectivamente, que alteram o espectro de absorção (fig.16).

Comparando-se o espectro de absorção da legHb na presença e na ausência de acetato (fig.17), observa-se que a formação do complexo (legHb.acetato) causa um aumento da absorvância em 496 e 622 nm, enquanto em 530 e 572 nm ocorre uma redução da absorvância. Na região do 350-450 nm não foi observada nenhuma variação no espectro de absorção em função da ligação deste anion (resultados não mostrados).

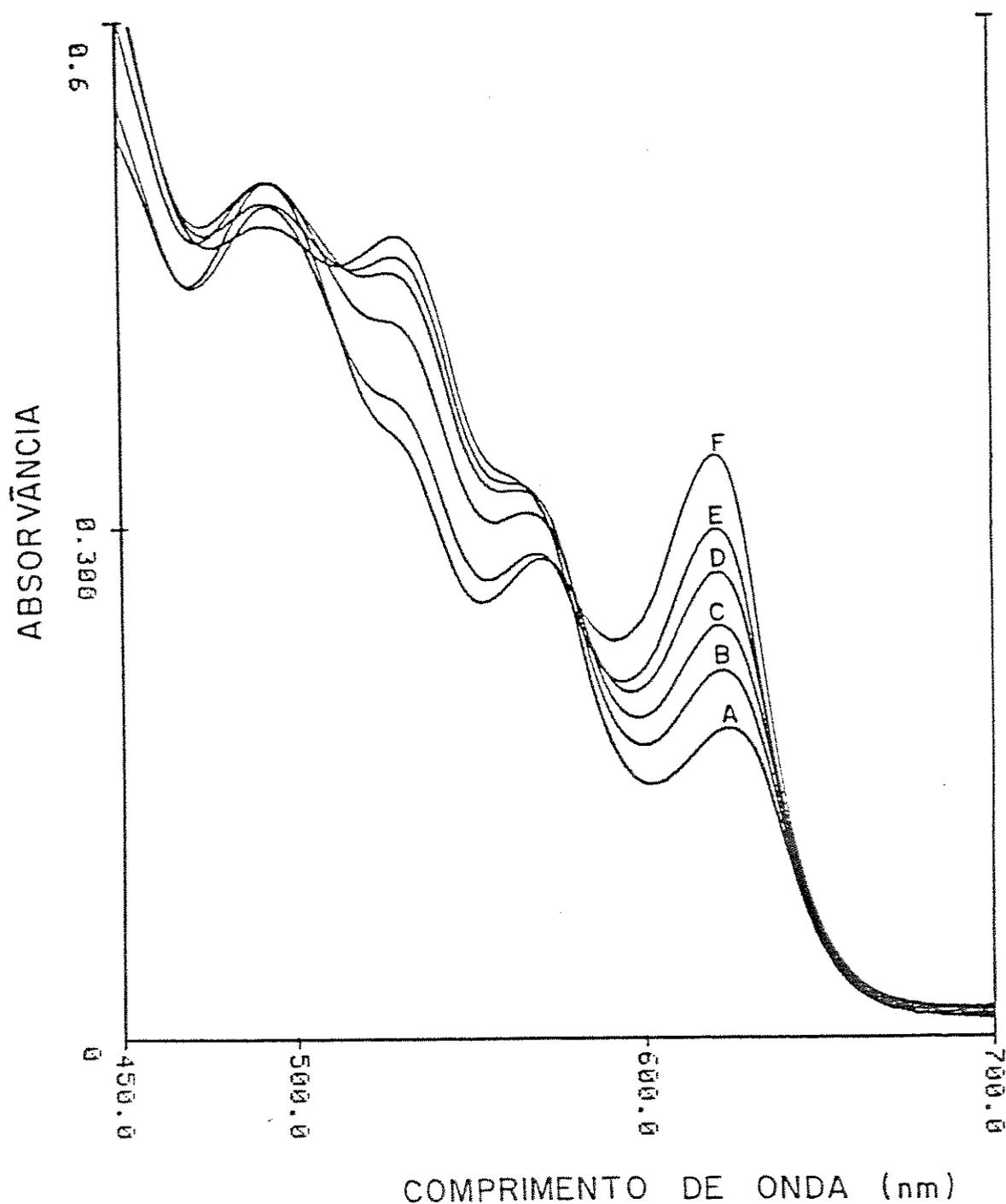


Figura 16: Variação do espectro de absorção na região visível (450-700 nm) da legHb ( $\text{Fe}^{3+}$ ) em função da complexação com acetato de sódio.

Adicionou-se às amostras de legHb 54  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8, acetato de sódio nas concentrações finais de: zero (A); 0,05 M (B); 0,10 M (C); 0,30 M (D); 0,60 M (E); 1 M (F). Concentrações acima de 1 M, não causam variação no espectro.

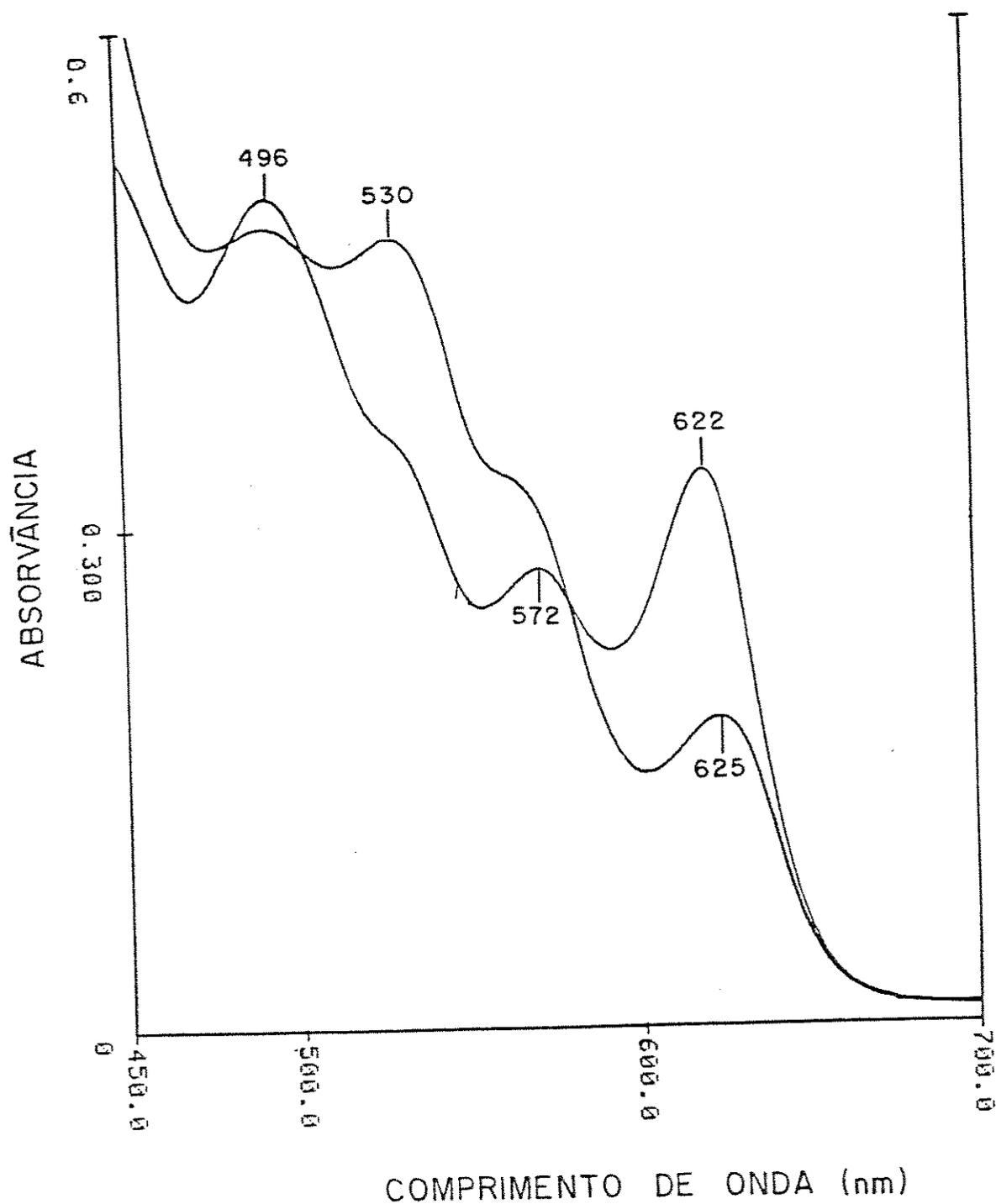


Figura 17: Espectro de absorção da legHb (Fe<sup>3+</sup>) livre e complexada com acetato.

A saturação da legHb com acetato 1M, apresenta absorção máxima em 496, 572 e 622 nm, enquanto na legHb livre de acetato os picos de absorção situam-se em 530 e 625 nm. As amostras foram as mesmas empregadas nos espectros da fig.16 .

20 - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE AFINIDADE (K) DA LEGHB  
PELO ANION ACETATO

As variações no espectro de absorção indicadas na fig.16, permitem a quantificação da formação do complexo e foram utilizadas para a determinação das constantes de afinidade pelo anion acetato. Como a maior variação na absorvância ocorre em 530 e 620 nm, uma série de determinações da Abs. foram feitas nestes comprimentos de onda, tanto para o componente I quanto para o V, na presença de várias concentrações de acetato.

A quantificação do complexo em cada concentração de acetato foi calculada considerando-se que a variação máxima da absorvância (Abs.legHb saturada - Abs.legHb livre) corresponde a 100% de formação do complexo ou de saturação, pode-se determinar as saturações intermediárias através da variação de Abs. em cada adição, dada pela diferença (Abs.em cada adição - Abs.legHb livre). O grau de saturação Y é determinado por:

$$Y = \frac{\text{Abs.em cada adição} - \text{Abs.legHb livre}}{\text{Abs.legHb saturada} - \text{Abs.legHb livre}}$$

Os valores de Y para cada concentração acetato, definem a curva de titulação, através da qual a constante de afinidade pode ser determinada. A conversão da curva de titulação para a forma linear, foi utilizada para determinação gráfica do valor da constante de afinidade dos componentes I e V em 530 nm (fig.18 e 19) e em 620 nm (fig.20 e 21). O valor de log [acetato] no ponto de intersecção da reta corresponde a  $-\log K$ .

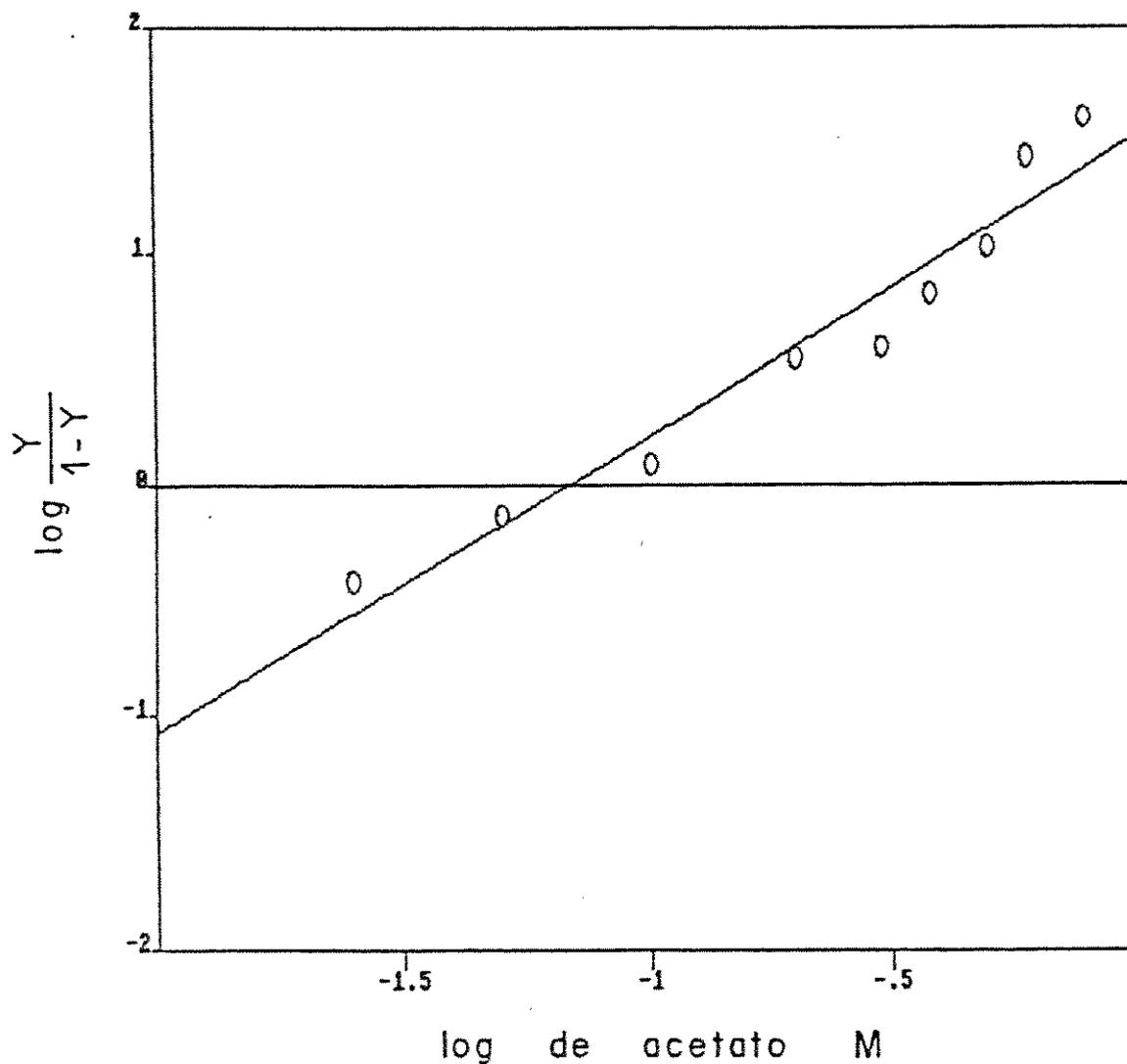


Figura 18: Determinação gráfica do valor da constante de afinidade de K do componente I pelo anion acetato em 530 nm.

A análise da variação da abs. em 530 nm fig.16 em função da adição de acetato, forneceu um valor de  $K = 14,45 \text{ M}^{-1}$ . As condições experimentais foram as mesmas da fig.16.

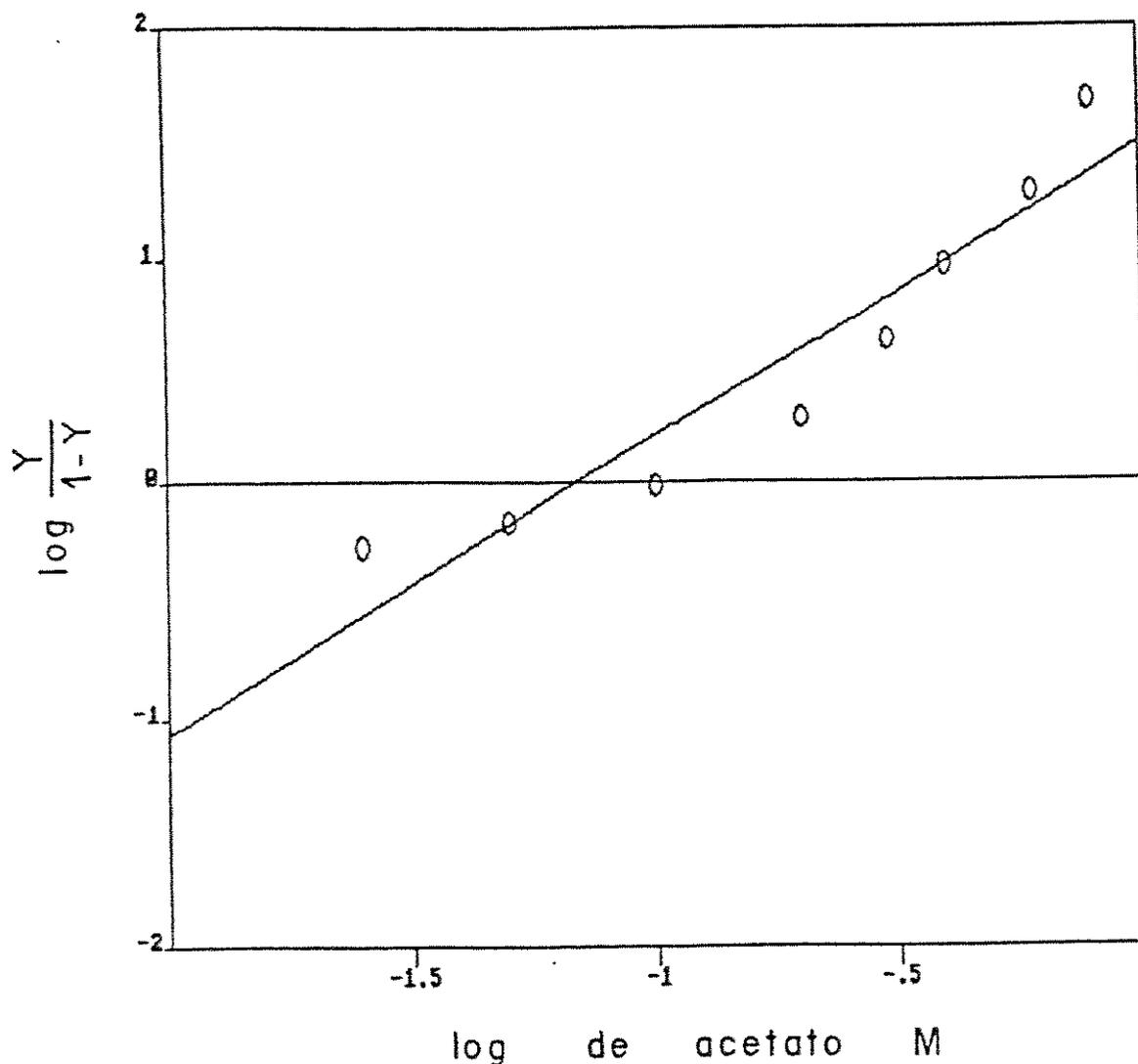


Figura 19: Determinação da constante de afinidade K do componente V pelo anion acetato em 530 nm.

A variação da abs. em 530 nm causada pela adição de acetato, em condições idênticas às da fig.16 resultou em um valor de  $K = 14,79 \text{ M}^{-1}$ .

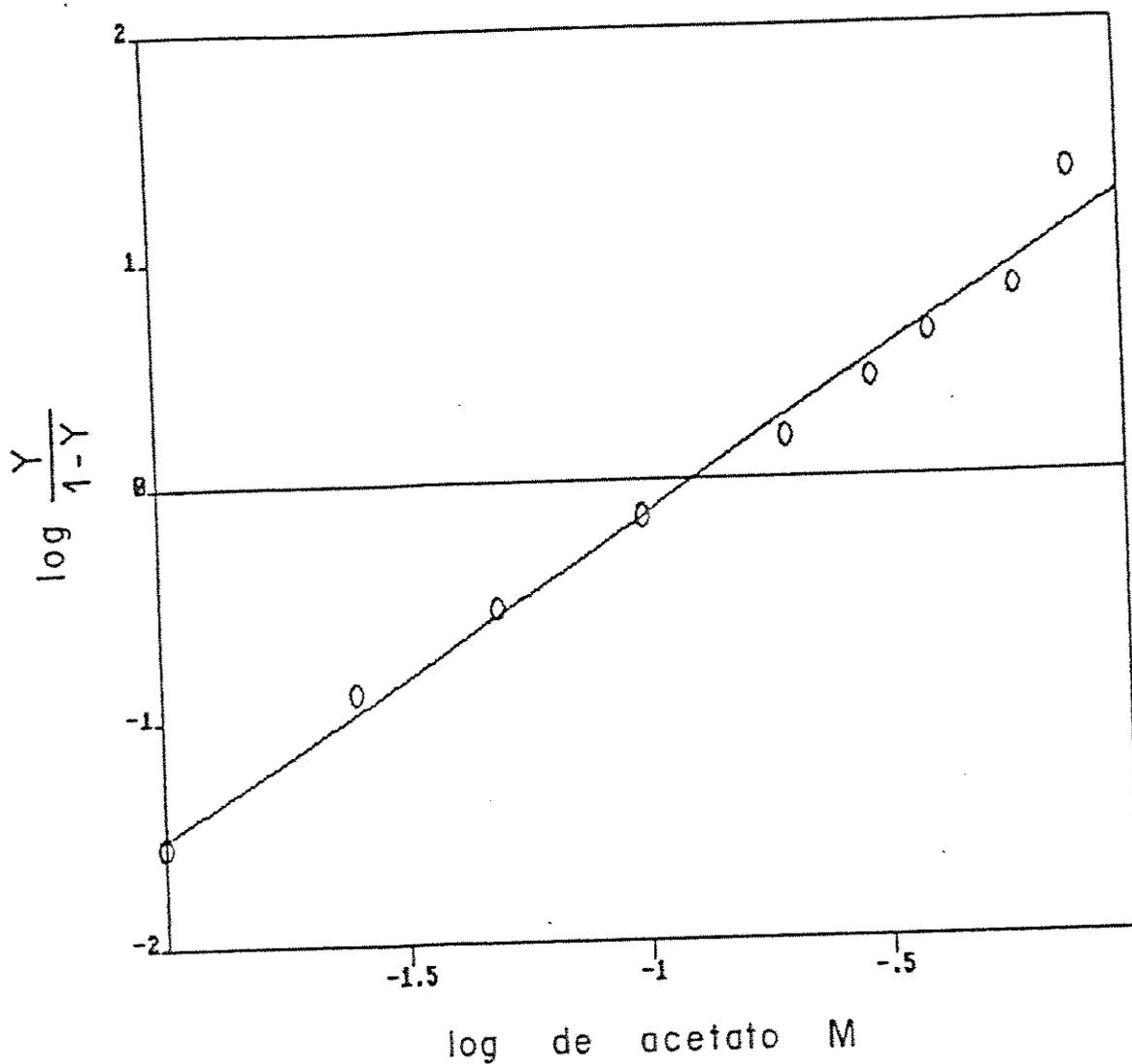


Figura 20: Determinação gráfica da constante de afinidade K do componente I pelo anion acetato em 620 nm.

O aumento da abs. em 620 nm analisado em função do aumento da concentração do acetato forneceu um valor de  $K = 7,87 \text{ M}^{-1}$ , nas condições descritas para a fig.16 .

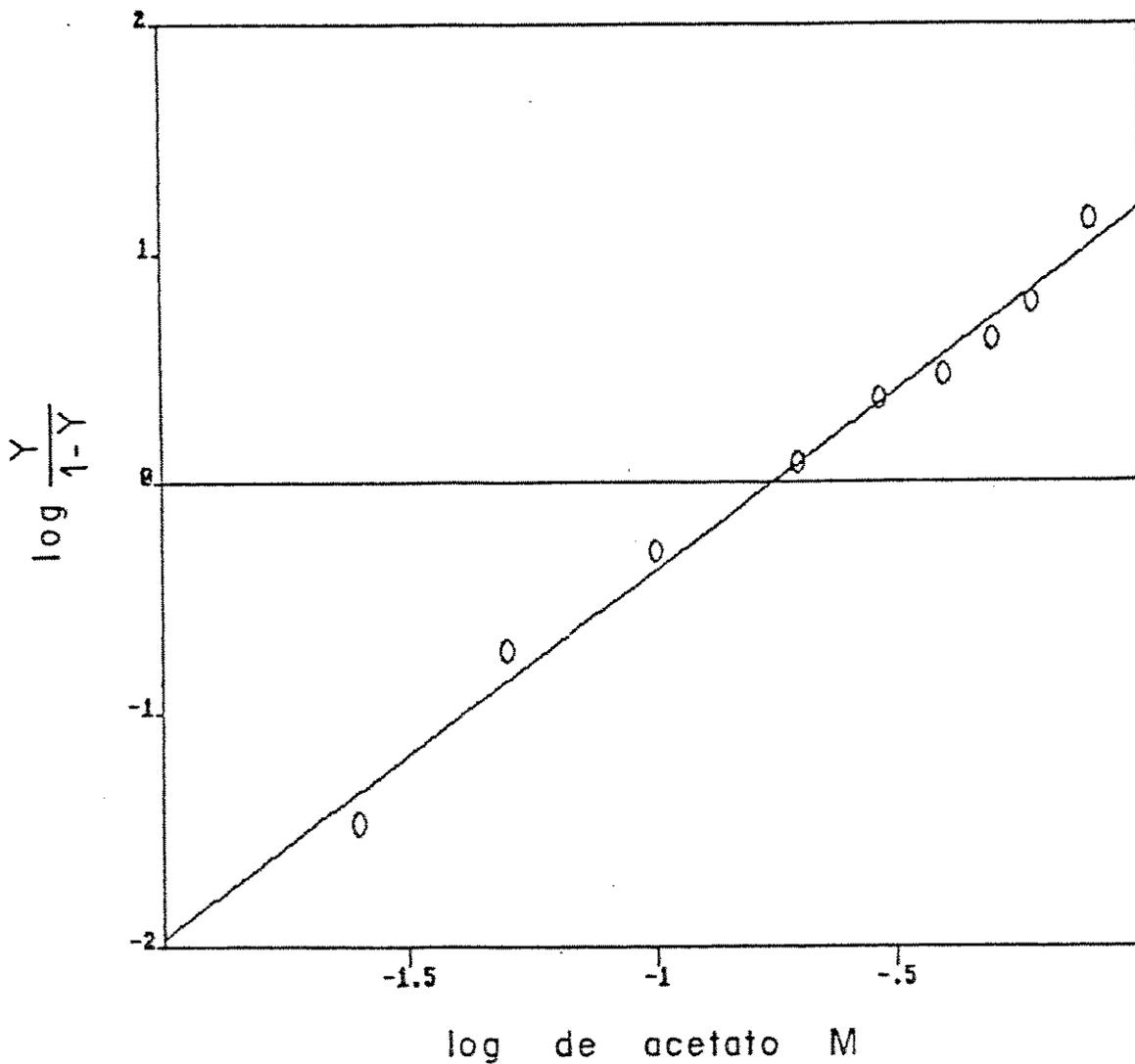


Figura 21: Determinação da constante de afinidade  $K$  do componente  $V$  pelo anion acetato em 620 nm.

O aumento da abs. em 620 nm devido à adição crescente de acetato resultou em  $K = 5,71 \text{ M}^{-1}$ . As condições experimentais, foram as da fig.16

A afinidade da legHb pelo anion acetato determinada através da constante de afinidade pelo método gráfico, está indicada na tabela 7.

Tabela 7: Afinidade da legHb pelo anion acetato. Comparação dos valores das constantes de afinidade (K) dos componentes I e V determinados graficamente em 530 nm e 620 nm.

	K em 530 nm	K em 620 nm
Componente I	14,45 M <sup>-1</sup> (fig.18)	7,87 M <sup>-1</sup> (fig.20)
Componente V	14,79 M <sup>-1</sup> (fig.19)	5,71 M <sup>-1</sup> (fig.21)

Em 530 nm praticamente não há variação pela afinidade entre os componentes, enquanto em 620 nm uma pequena diferença é observada, tendo o componente V menor afinidade pelo anion.

## DISCUSSÃO

### 1. EFETIVIDADE DOS NÓDULOS

A efetividade dos nódulos de plantas leguminosas pode ser medida pela atividade da nitrogenase ou pela concentração da legHb, que são parâmetros dependentes durante a fixação de  $N_2$  (Becana e colab. 1986).

Entre os vários fatores que influenciam a obtenção de nódulos efetivos, a disponibilidade de estirpes de *Rhizobium* específicas e eficientes para a inoculação, é o primeiro passo para o cultivo de plantas leguminosas em casa de vegetação com condições controladas. As leguminosas produtoras de grão como soja, feijão etc., podem ser cultivadas em condições controladas, sem risco de nodulação ineficiente devido à disponibilidade de estirpes de *Rhizobium* eficientes para inoculação.

Com relação à mucuna preta, a baixa eficiência da estirpe de *Rhizobium*, inviabilizou o cultivo destas plantas por inoculação e a nodulação por *Rhizobium* nativos presentes no solo utilizado foi empregada (tabela 1). A efetividade dos nódulos (mg de legHb/g de nódulo), nas plantas noduladas naturalmente, foi máxima nos nódulos maduros no estágio vegetativo tendo-se obtido 1,23 mg/g de nódulo. Este valor está dentro dos limites encontrados para outras leguminosas noduladas especificamente, cujo teor de legHb nos nódulos maduros varia entre 1 a 3 mg/g de nódulo (Dilworth, 1980).

O segundo aspecto analisado, foi a influência da idade da planta no teor de legHb dos nódulos. Considerando-se que 1,23 mg/g de nódulo é a quantidade máxima de legHb sintetizada nos nódulos em estágio vegetativo como correspondente a 100%, a redução da síntese com a idade é marcante na frutificação onde apenas 0,35 mg/g está presente (tabela 2).

O baixo teor de legHb na frutificação, dá aos nódulos um aspecto interno bastante diferente do observado nos estádios anteriores. Os nódulos de mucuna são de crescimento indeterminado do tipo astrogalóide e fazendo-se o corte longitudinal dos nódulos colhidos na frutificação observa-se que a coloração rosa característica da presença de legHb está reduzida às extremidades das diferentes pontas de crescimento, enquanto na parte central tem-se uma coloração verde decorrente da degradação de grupos heme (Lehtovaara, 1978). Os nódulos dos estádios anteriores possuem a coloração rosa difundida em toda a superfície interna.

## 2. PURIFICAÇÃO DA LEGHB

A determinação da concentração da legHb e de proteínas totais no extrato de tecido nodular, não foi possível devido à presença dos pigmentos que recobrem a superfície externa do nódulos de mucuna os quais logo após a colheita dos nódulos lhes dão uma coloração marrom escura. Estes pigmentos são solúveis sendo extraídos dos nódulos juntamente com a legHb. O uso de PVPP, diálise ou filtração em gel foram ineficientes para eliminação dos pigmentos. A cromatografia em DEAE-celulose pH 7,0, mostrou-se

eficiente e a quantidade de legHb livre de pigmentos após esta etapa foi considerada 100% da existente nos nódulos, desprezando-se possíveis perdas nas etapas anteriores. A partir desta etapa, a purificação foi avaliada em termos de recuperação até obtenção dos componentes isolados, uma vez que a legHb livre de pigmentos não contem qualquer contaminação, conforme indicado por eletroforese na fig.3. O rendimento final de 63% após a separação dos componentes indicado na tabela 3, foi consequência de uma baixa recuperação na filtração em gel para eliminação do oxidante. Nesta etapa a recuperação de apenas 74% foi devida à proximidade no deslocamento da legHb e do oxidante que se mistura com o final da eluição da legHb tendo-se desprezado esta fração para garantir a ausência do oxidante na preparação. Embora na etapa anterior (cromatografia em DEAE pH 7,0) tenha sido obtida a legHb livre de pigmentos e de proteínas contaminantes, o espectro de absorção foi indicativo de mistura de legHb oxigenada e oxidada, sendo necessária a oxidação para garantir uma boa separação dos componentes. A recuperação após a separação dos componentes de 85% foi obtida nas cromatografias feitas com quantidades de legHb superiores a 100 mg, porém quando a quantidade de legHb foi inferior a este valor, a recuperação diminui devido à diluição dos componentes.

#### Separação dos componentes

A separação dos componentes da legHb de diferentes espécies de leguminosas, normalmente é feita por cromatografia em DEAE

na forma acetato pH 5,2, sendo os componentes classificados em função da força iônica empregada para a eluição. Embora nem sempre se tenha uma boa separação devido à pequena diferença molecular entre os componentes de uma mesma espécie, as propriedades químicas podem ajudar a estabelecer as diferenças moleculares.

Em relação à mucuna preta, a separação e quantificação dos componentes em diferentes estádios de desenvolvimento teve como objetivo comparar os tipos de componentes sintetizados quando os nódulos contêm alto teor de legHb (estádio vegetativo e floração) com os encontrados nos nódulos contendo baixo teor de legHb (frutificação).

Os cinco componentes separados a partir da legHb purificada no estágio de floração (fig.1), sendo os três primeiros eluídos na mesma força iônica, foram considerados como diferentes tipos moleculares em função da velocidade de eluição. O componente I não se liga à resina sendo eluído sem risco de contaminação do componente II. O componente II e III não foram totalmente separados uma vez que o final da eluição do componente II mistura-se com o início da eluição do componente III tendo-se desprezado esta mistura que corresponde a aproximadamente 3% da legHb aplicada na coluna. Os componentes IV e V não deixam dúvidas quanto à separação por serem eluídos em força iônica bastante diferente. 30 e 60 mM respectivamente.

Na frutificação, o perfil cromatográfico da fig.2, mostrando ausência do componente II, parece não ser um artefato de diluição uma vez que a separação dos componentes com a mesma quantidade de legHb total purificada no estágio de floração mostra a presença

do componente II.

A quantidade relativa dos componentes nestes dois estádios de desenvolvimento, resumida na tabela 6 mostra que a redução na síntese da legHb total de 1,01 mg/g de nódulo na floração para 0,35 mg/g de nódulo na frutificação, não é acompanhada de uma redução proporcional na quantidade relativa dos componentes. O componente III é o componente principal nestes dois estádios correspondendo a cerca 35% da legHb bruta. Os componentes menos aniônicos que o componente III que na floração são o I e o II são os componentes secundários e correspondem a 14,8% e 22,3% respectivamente, enquanto na frutificação o componente I tem sua quantidade relativa reduzida à metade (7,8%) e o componente II não foi detectado. Os componentes mais aniônicos IV e V presentes em baixa concentração na floração 2,1% e 10,6% respectivamente, têm suas quantidades relativas dobradas na frutificação 5% e 23,6% respectivamente.

A variação na concentração dos componentes em função da idade da planta é um evento comum nas leguminosas. Embora os resultados disponíveis na literatura refiram-se a legHb purificada em nódulos jovens e nódulos maduros durante a fase vegetativa, a concentração de determinados componentes nos nódulos jovens de soja difere da encontrada nos nódulos maduros (Fuchsman e Appleby, 1979). Em ervilha resultados semelhantes também foram obtidos (Uheda e Syōno, 1982 a). A ausência de componente como no caso de mucuna não é citada na literatura, uma vez que as legHb são normalmente purificadas quando a sua síntese nos nódulos é alta, é possível que em outras espécies de leguminosas também ocorra

redução total na síntese de algum componente quando os nódulos estão em fase de senescência, como no caso de mucuna em estágio de frutificação

#### Grau de purificação da legHb

O perfil eletroforético da legHb total e dos componentes em SDS-PAGE (fig.3) indicando uma banda contaminante apenas no componente V, pode ser atribuída a alta força iônica (60 mM) empregada para eluir este componente, a qual pode ter causado o deslocamento de proteínas contaminantes que permanecem presas à resina durante a eluição dos componentes com força iônica mais baixa.

### 3. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O uso de SDS-PAGE para estimar o PM da legHB de mucuna apresentou algumas limitações conforme comentado na padronização do método. Obtivemos para a legHb de mucuna dissociada uma pequena diferença na migração (fig.5), que forneceu dois valores de PM 14600 e 15000. Atribuimos esta variação a uma limitação do método, sendo a média destes valores 14800 o PM mais provável para a legHb total e para os componentes. Pequenas variações quanto ao PM dos componentes da legHb de várias espécies de leguminosas tem sido citada tanto para a forma desnaturada como para a forma nativa (Boguzs, 1987).

#### 4. PROPRIEDADES ESPECTRAIS DAS LEGHB DE MUCUNA PRETA

As legHbs são geralmente estudadas quanto às suas propriedades químicas pelo método espectrofotométrico. Os nossos estudos visaram estabelecer diferenças entre os componentes que pudessem esclarecer o comportamento cromatográfico indicado na fig.1 dos diferentes componentes. Considerando-se que o componente I eluído com acetato 10 mM e o componente V eluído com acetato 60 mM poderiam apresentar a exemplo dos dois componentes principais da metalegHb de soja (Ellfolk 1961 b) propriedades ópticas diferentes os mesmos foram escolhidos para estudos.

##### 4.1 Espectros de absorção da forma oxigenada e reduzida

A forma oxigenada e reduzida ( $Fe^{2+}$ ) dos componentes I e V não mostraram qualquer diferença entre si com relação aos picos de absorção na região visível (fig.6 e fig.7). Os comprimentos de onda correspondentes à absorção máxima da forma oxigenada, 411, 540 e 574 nm e da forma reduzida 427 e 557nm, coincidem com os obtidos para os componentes da legHb de soja (Dilworth, 1980).

##### 4.2 Transição ácida-alcalina

As mudanças no espectro de absorção da forma oxidada da legHb induzidas pelo aumento do pH, se caracteriza por um aumento da absorvância em 543 e 575nm (fig.9), enquanto na região de Soret a absorvância diminui com o aumento do pH e o pico é deslo-

cado de 404 nm para 411nm (fig.11).

Considerando-se que a variação no espectro de absorção é consequência do grau de dissociação da legHb e que em pH 5,3 o espectro é definido só pela forma não dissociada ( $\text{legHb.Fe}^{3+}\text{-H}_2\text{O}$ ) e que em pH 10,5 apenas a forma dissociada está presente ( $\text{legHb.Fe}^{3+}\text{-OH}$ ), sendo estas as formas ácida e alcalina respectivamente, a quantificação destas formas nos valores intermediários de pH, permitem a determinação do pK da transição ácida-alcalina.

As curvas de titulação dos componentes I e V indicadas nas fig.12 e 14 respectivamente, forneceram os valores de pK 8.92 e 9,01, conforme fig.13 e 15. Embora estes valores sejam muito próximos entre si, eles são significativamente maiores que os valores de pK dos componentes A e C da legHb de soja que possuem espectros idênticos aos da legHb de mucuna porém os seus pK de transição são 8,34 e 8.16 respectivamente (Ellfolk, 1961 b)

A transição ácida-alcalina é uma característica das legHbs e das mioglobinas animais, sendo o valor de pH escolhido para estudos destas hemoproteínas um fator importante, uma vez que a reatividade das formas ácida e alcalina são diferentes.

#### 4.3 Afinidade da legHb pelo anion acetato

A ligação do anion acetato à legHb é caracterizada pela coloração verde clara que este ligante confere às legHbs de maneira geral e cujo espectro de absorção é característico (fig.16). Sendo um ligante específico para as legHbs, a determinação das suas constantes de afinidade é um importante parâmetro para comparar

as legHbs de diferentes espécies de leguminosas.

Os métodos empregados geralmente se baseiam em medidas espectrofotométrias, porém nem sempre feitas no mesmo comprimento de onda o que dificulta a comparação dos valores, uma vez que dependendo da região do espectro podem se obter diferentes valores para a constante de afinidade (Appleby, 1976).

As condições mais próximas das utilizadas neste trabalho foram aplicadas para os estudos da legHb A e C de soja, porém a variação da absorvância foi medida em 555 nm, (Ellfolk, 1961 b). Estes dois componentes não variaram em relação à afinidade pelo anion e o valor de  $K$  foi igual a  $100 \text{ M}^{-1}$ , sendo a concentração de acetato de  $0,01 \text{ M}$  a que causa 50% de saturação ( $Y$ ).

Os componentes I e V da legHb de mucuna mostram uma afinidade pelo anion acetato dependente do comprimento de onda em que o complexo foi quantificado. Em 530 nm os componentes I e V praticamente não variam em relação às suas constantes de associação as quais foram respectivamente  $14,45 \text{ M}^{-1}$  e  $14,79 \text{ M}^{-1}$  e as concentrações de acetato foram  $0,069 \text{ M}$  e  $0,068 \text{ M}$ . Porém em 620 nm o componente I teve uma redução na afinidade pelo anion de 1,8 vezes enquanto o para o componente V a redução foi maior ainda sendo de 2,6 vezes. As constantes de associação resultantes foram de  $7,87 \text{ M}^{-1}$  e  $5,71 \text{ M}^{-1}$  para as concentrações de acetato  $0,127 \text{ M}$  e  $0,175 \text{ M}$ . Esta variação na afinidade não é significativa para explicar a diferença no comportamento cromatográfico destes 2 componentes, além de não se ter obtido qualquer variação na afinidade em 530 nm. Embora os comprimentos de onda utilizados, não sejam os mesmos empregados para determinação da afinidade da legHb de soja

pelo anion acetato, se forem considerados os valores da constante de associação obtida em 530 nm que é o comprimento de onda mais próximo do utilizado para soja, as legHb de mucuna têm uma afinidade por este anion cerca de 7 vezes menor.

Finalmente, acreditamos que as legHb de mucuna tem diferenças significativas em relação às legHb de soja tanto pela diferença do pK da transição ácida-alcalina quanto pela afinidade pelo anion acetato. Estudos com outros ligantes poderão fornecer maiores informações para verificação do grau de homologia da legHb de mucuna com outras legHb bem caracterizadas.

O estudo físico-químico comparativo destas proteínas foi o instrumento molecular inicial para estudos subsequentes na área de biologia molecular que possam detectar o grau de homologia e esclarecer o processo evolutivo da família globina.

## CONCLUSÕES

1. A concentração de legHb nos nódulos de mucuna preta nos em diferentes estádios de desenvolvimento, mostrou uma redução de 72% na fase de frutificação.
2. Nos nódulos de mucuna preta verificou-se a presença de 5 componentes por cromatografia de troca iônica no estágio vegetativo e de 4 na fase de frutificação.
3. O peso molecular destes componentes utilizando a técnica de SDS-PAGE foi de 14800.
4. As propriedades espectrais da legHb nas diferentes formas de oxidação ( $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ) foram determinadas e demonstraram ser semelhantes às de soja.
5. O valor de pK de transição ácida-alcalina para os componentes I e V foi determinado, sendo respectivamente 8,92 e 9,01, divergindo do valor de pK determinado para soja.
6. A afinidade de ligação da legHb pelo anion acetato foi estimada como sendo 7 vezes menor do que a de soja.

## RESUMO

As leghemoglobinas (legHb) sintetizadas nos nódulos de raiz de plantas leguminosas durante a fixação simbiótica de  $N_2$ , são semelhantes às mioglobinas animais quanto à estrutura e função. A síntese da legHb nos nódulos é produto da expressão de diferentes genes e os tipos moleculares em uma mesma espécie podem ser identificados por cromatografia de troca iônica. A legHb de mucuna preta, foi purificada por precipitação do extrato de tecido nodular com sulfato de amônio entre 55% e 80% de saturação; passagem em DEAE-celulose pH 7,0 para retenção dos pigmentos; oxidação com ferricianeto de potássio e passagem em G-25 para eliminação do oxidante. A legHb total, na forma oxidada e complexada com acetato foi aplicada em DEAE-celulose equilibrada com tampão acetato pH 5,2. Os componentes sintetizados nos diferentes estádios foram separados pela aplicação de gradiente linear de acetato. O conteúdo de legHb total no estágio vegetativo foi de 1,23 mg/g de nódulo; na floração foi 1,01 mg/g de nódulo e na frutificação 0,35 mg/g de nódulo. O perfil cromatográfico no estágio vegetativo e na floração é o mesmo e foram identificados 5 componentes. Na frutificação foram encontrados apenas 4 componentes. A redução na síntese de legHb com a idade da planta não é seguida de uma redução proporcional na quantidade relativa dos componentes. Os componentes mais diferenciados pelo comportamento cromatográfico foram caracterizados quanto : ao peso molecular, propriedades espectrais, afinidade pelo anion acetato e  $pK$  da transição ácida alcalina.

## REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appleby, C.A.; Wittenberg, B.A. & Wittenberg, J.B. (1973)  
Nicotinic acid as a ligand affecting leghemoglobin structure  
and oxygen reactivity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70: 564-568.
- Appleby, C.A. (1974) Leghemoglobin. In: Biology of Nitrogen  
Fixation. Ed. A. Quispel. Amsterdam, North-Holland Publishing  
CO., 521-554.
- Appleby, C.A.; Nicola, N.A.; Hurrell, J.G.R. & Leach, S.J.  
(1975) Characterization and improved separation of soybean  
leghemoglobins. Biochemistry, 14: 4444-4450.
- Appleby, C.A.; Blumberg, W.E.; Peisach, J.; Wittenberg, B.A.; &  
Wittenberg, (1976) J. Leghemoglobin. An electron paramagnetic  
resonance and optical spectral study of the free protein and  
its complexes with nicotinate and acetate. J. Biol. Chem., 251:  
6090-6096.
- Appleby, C.A.; Bradbury, J.H.; Morris, R.J.; Wittenberg, B.A.;  
Wittenberg, J.B. & Wright, P.E. (1983) Leghemoglobin: Kinetic,  
nuclear magnetic resonance and optical studies of pH dependence  
of oxygen and carbon monoxide binding. J. Biol. Chem., 258:  
2254-2259.

- Appleby, C.A. (1984) Leghemoglobin and Rhizobium Respiration. Ann. Rev. Plant Physiol., 35: 443-478.
- Appleby, C.A.; Bogusz, D.; Dennis, E.S. & Peacock, W.J. (1988) A role for haemoglobin in all plant roots? Plant, Cell and Environment, 11: 359-367.
- Arutyunyan, E.G. (1981) The structure of leghemoglobin. Mol. Biol., 15: 27-44.
- Baulcombe, D. & Verma, D.P.S. (1978) Preparation of a complementary DNA for leghaemoglobin and direct demonstration that leghaemoglobin is encoded by the soybean genome. Nucleic Acids Res., 5: 4141-4153.
- Becana, M.; Gogorcena, Y.; Aparicio-Tejo, P.M. & Sanches-Dias, M. (1986) Nitrogen fixation and leghemoglobin content during vegetative growth of alfalfa. J. Plant Physiol., 123: 117-125.
- Begersen, F.J. (1978) Leghaemoglobin, oxygen supply and nitrogen fixation: Studies with soybean nodules. In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. Ed. J. Dobereiner, R.H. Burris & A. Hollaender. New York & London, Plenum Press, p.247-261.

- Brown, G.G.; Lee, J.S.; Brisson, N. & Verma, D.P.S. (1984) The evolution of a plant globin gene family. J. Mol. Evol., 21: 19-32.
- Bogusz, D.; Kortt, A.A. & Appleby, C.A. (1987) Sesbania rostrata root and stem nodule leghemoglobins: Purification and relationships among the seven major components. Arch. Biochem. Biophys., 254: 263-271.
- Bogusz, D.; Appleby, C.A.; Landsmann, J.; Dennis, E.S.; Trinick, M.J. & Peacock, W.J. (1980) Function haemoglobin genes in non-nodulation plants. Nature, 331: 178-180.
- Chrambach, A. & Rodbard, D. (1981) "Quantitative" and preparative polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Ed. B.D. Hames & D. Rickwood. Oxford, England, 93-141.
- Corby, H.D.L. (1981) The systematic value of leguminous root nodules. In: Advances in legume systematics. Ed. R.M. Polhill & P.H. Raven, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 657-669.
- Dilworth, M.J. (1980) Leghemoglobins. Methods Enzymol. 69, part C: 812-823.
- Dixon, R. & Wheeler, C.T. (1986) The Symbioses. In: Nitrogen fixation in plants. Glasgow, Blackie & Son Limited, p. 15-44.

- Ellfolk, N. (1960) Crystalline leghemoglobin. 1. Purification procedure. Acta Chem. Scan., 14: 609-616.
- Ellfolk, N. (1961 a) Crystalline leghemoglobin. III Amino acid composition of the two main components. Acta Chem. Scan., 15: 545-554.
- Ellfolk, N. (1961 b) Crystalline leghemoglobin. Spectroscopic studies of two main metleghemoglobin components and some of their fatty acid complexes. Acta Chem. Scan., 15: 975-984.
- Fleming, A.I.; Wittenberg, J.B.; Wittenberg, B.A.; Dudman, W.F. & Appleby, C.A. (1987) The purification, characterization and ligand-binding kinetics of hemoglobins from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca* - *Frankia* symbiosis. Biochim. Biophys. Acta, 911: 209-220.
- Fuchsman, W.H. & Appleby, C.A. (1979) Separation and determination of the relative concentrations of the homogeneous components of soybean leghemoglobin by isoelectric focusing. Biochim. Biophys. Acta, 579: 314-324.
- Hyldeg-Nielsen, J.J.; Jensen, E.D.; Paludan, K.; Wiborg, O.; Garrett, R.; Jorgensen, P. & Marcker, K.A. (1982) The primary structures of two leghemoglobin genes from soybean. Nucleic Acids Res. 10: 689-701.

- Imamura, T.; Riggs, A. & Gibson, Q.H. (1972) Equilibria and kinetics of ligand binding by leghemoglobin from soybean root nodules. J. Biol. Chem., 247: 521-526.
- Jing, Y.; Paau, A.S. & Brill, W. J. (1982) Leghemoglobins from alfalfa (*Medicago sativa* L. Vernal) root nodules. I. Purification and in vitro synthesis of five leghemoglobin components. Plant Sci. Lett., 25: 119-132.
- Keithley, J.H. & Nadler, K. D. (1983) Protoporphyrin formation in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 154: 838-845.
- Kortt, A.A.; Burns, J.E.; Trinick, M.J. & Appleby, C.A. (1985) The amino acid sequence of hemoglobin I from *Parasponia andersonii*, a non-leguminous plant. FEBS Lett., 180: 55-60.
- Landsmann, J.; Dennis, E.S.; Higgins, T.J.V.; Appleby, C.A.; Kortt, A.A. & Peacock, W.J. (1986) Common evolutionary origin of legume and non-legume plant haemoglobins. Nature, 324: 166-168.
- Lehtovaara, P.; Perttala, U. (1978) Bile pigment formation from different leghaemoglobins: Methine-bridge specificity of coupled oxidation. Biochem. J., 176: 359-364.

- Noel, K.D.; Stacey, G.; Tandon, S.R.; Silver, L.E. & Brill, W.J. (1982) Rhizobium japonicum mutants defective in symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol., 152: 485-494.
- Ollis, D.L.; Appleby, C.A.; Colman, P.M.; Cutten, A.E.C. & Guss, J.M. (1983) Crystal structure of soybean ferric leghemoglobin A nicotinate at a resolution of 3,3 Å. Aust. J. Chem., 36: 451-468.
- Runnegar, B.N. (1984) Derivation of the globins from type b cytochromes. J. Mol. Evol., 21: 33-41.
- Riggs, A.F. (1990) Aspects of the origin and evolution of non-vertebrate Haemoglobins (in press).
- Sprent, J.I. (1984) Nitrogen Fixation. In: Plant Physiology. Ed. M. B. Wilkins, London, Pitman Publishing Inc., p. 249-273.
- Sprent, J.I. & Faria, S.M. (1989) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. In: Nitrogen fixation with non-legumes. Ed. F.A. Skinner; R.M. Boddey & I. Fendrik, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, p. 3-11.

- Stetzkowski, F.; Banerjee, R.; Marden, M.C.; Beece, D.K.; Bowne, S.F.; Doster, W.; Eisenstein, L.; Lou Reinish, H.F.; Shyamsunder, E. & Jung, C. (1985) Dynamics of dioxygen and carbon monoxide binding to soybean leghemoglobin. J. Biol. Chem. 260: 8803-8809.
- Trinick, M.J. & Hadobas, P.A. (1989) Biology of the Parasponia - Brady rhizobium symbiosis. In: Nitrogen fixation with non-legumes. Ed. F.A. Skinner; R.M. Boddey & I. Fendrik, Netherlands, Kluwer Acad. Publishers, p. 25-33.
- Uheda, E. & Syőno, K. (1982 a) Physiological role of leghaemoglobin heterogeneity in pea root nodule development. Plant Cell Physiol., 23: 75-84.
- Uheda, E. & Syőno, K. (1982 b) Effects of leghemoglobin components on nitrogen fixation and oxygen consumption. Plant Cell Physiol., 23: 85-90.
- Verma, D.P.S.; Nash, D.T. & Schulman, H.M. (1974) Isolation and in vitro translation of soybean leghaemoglobin mRNA. Nature, 251: 74-77.

Verma, D.P.S.; Ball, S.; Guérin, C. & Wanamaker, L. (1979)

Leghemoglobin biosynthesis in soybean root nodules.

Characterization of the nascent and released peptides and relative rate of synthesis of the major leghaemoglobins.

Biochemistry, 18: 476-483.

Wittenberg, J.B.; Appleby, C.A. & Wittenberg, B.A. (1972) The

Kinetics of the reactions of leghemoglobin with oxygen and

carbon monoxide. J. Biol. Chem., 217: 527-531.

Whittaker, R.G.; Lennox, S. & Appleby, C.A. (1981) Relationship

of the minor soybean leghemoglobin d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub> and d<sub>3</sub> to the major

leghemoglobins c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub> and c<sub>3</sub>. Biochem. Int., 3: 117-124.

Wittenberg, J.B. & Wittenberg, B.A. (1990) Mechanisms of

cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. Ann. Rev.

Biophys. Biophys. Chem., 19: 217-241.

Yates, M.G. (1980) Biochemistry of Nitrogen Fixation. In: The

Biochemistry of Plants. Ed. B.J. Mifflin, London, Academic

Press Inc., Vol. 5, p. 1-57.