

7 Lectinas na associação simbiótica do rizóbio-leguminosa

Cosme Rafael Martínez

Engenheiro Agrônomo, Dr., Universidade Federal da Paraíba/UFPB
E-mail: cosme@dbm.ufpb.br

Márcia do Vale Barreto Figueiredo

Bióloga, Dra., Instituto Agronômico de Pernambuco/IPA/CARHP

José Luiz de Lima Filho

Médico, Dr., Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Benildo Sousa Cavada

Engenheiro Agrônomo, Dr., Universidade Federal do Ceará/UFC

INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas com estruturas muito diversas que se ligam reversivelmente e com especificidade elevada para mono e oligossacarídeos, sem modificação enzimática. São proteínas ubíquas podendo ser encontradas em bactérias, plantas e animais. As lectinas de leguminosas, na maioria, apresentam-se como tetrâmeros ou dímeros, onde cada monômero apresenta um núcleo hidrofóbico e um sítio de ligação a carboidratos (Loris et al., 1998; Vijayan & Chandra, 1999). A possibilidade de as lectinas de raiz serem importantes na simbiose rizóbio-leguminosa tem atraído a atenção por décadas. Para Etzler (1985), essa hipótese foi sugerida por Krüpe no início de 1956 e, posteriormente, retomada por Bohlool & Schmidt (1974). Embora grandes esforços tenham sido investidos nesse tópico, a hipótese é ainda matéria de debate (Hirsch et al., 1995; Brewin & Kardansky, 1997; Kijne et al., 1997; Hirsch, 1999; Laus & Kijne, 2004).

1 O MODELO DE LIGAÇÃO RIZÓBIO-LEGUMINOSA MEDIADO POR LECTINA

As primeiras indicações experimentais de que lectinas estão envolvidas na ligação do rizóbio à superfície das raízes das leguminosas, como etapa inicial de reconhecimento entre simbiontes, foram mostradas por Bohlool & Schmidt (1974), Napoli et al. (1975) e Dazzo & Hubbell (1975). Bohlool & Schmidt (1974) mostraram que das 25 estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* testadas, espécie capaz de nodular a soja *Glycine max* (L.) Merr.), 22 delas ligam-se entre si quando resuspensas em extratos de sementes de soja contendo lectinas, em contraste com os outros rizóbios não-infecciosos. Napoli et al. (1975) indicaram que bactérias de *Rhizobium trifolii* aglutinaram-se frequentemente nas vizinhanças das raízes do trevo (*Trifolium repens* L.) e que mais de 90% dos pêlos radicais infectados estavam em contato físico com esses aglutinados bacterianos. A partir de dados experimentais de Dazzo & Hubbell (1975), é proposto um modelo de ligação preferencial de *R. trifolii* infeccioso na superfície das raízes do trevo por meio da conexão de seus receptores comuns de superfície (polissacarídeos de superfície da raiz e das bactérias) com uma lectina (com múltiplas valências) isolada das sementes do trevo (Figura 1A). Seus ensaios de inibição indicaram a D-glicose como a mais provável bloqueadora dessa reação de ligação entre as bactérias e a superfície da raiz.

A capacidade de induzir cordão de infecção da *R. trifolii* foi correlacionada com a ligação das bactérias à superfície de pêlos radicais do trevo (Dazzo et al., 1976). Estirpes de *R. trifolii* infecciosas mostraram, significativamente, maior número de bactérias ligadas à superfície das raízes do trevo que as estirpes não-infecciosas. As estirpes de *R. meliloti* e *R. trifolii* 403 não-infecciosa (inativadas a 80 °C por 10 min) tiveram menor número de bactérias ligadas às superfícies das raízes de alfafa (*Medicago sativa* L.). O pré-tratamento da estirpe infecciosa com o extrato de sementes do trevo (com atividade lectínica) aumentou sua habilidade de se ligar à superfície da raiz. O efeito mos-

trou-se específico, visto que o mesmo não foi observado na alfafa e no trevo, inoculados com *R. trifolii* 403 e *B. japonicum* 61A76, respectivamente, pré-tratados com o extrato de semente do trevo. A adição de D-glicose (10 mM) inibiu significativamente o número de bactérias ligadas de *R. trifolii* infecciosa. Os autores indicaram que a expressão de especificidade hospedeira na simbiose rizóbio-trevo inclui ligação preferencial do rizóbio infeccioso.

A lectina "trifolin" (específica para glicose) foi purificada das sementes e das raízes do trevo (Dazzo et al., 1978). A "trifolin" confirmou a especificidade de aglutinar estirpes infecciosas de *R. trifolii*. Anticorpos purificados para "trifolin" ligaram-se à região de pêlos radicais do trevo, porém, não para a da alfafa e a da ervilha (*Pisum sativum* L). A "trifolin" elui por ação da glicose a partir de raízes das plântulas do trevo intactas. Dazzo et al. (1978) sugerem que a "trifolin" está fixada a glico-receptores de superfície nas raízes do trevo. Dazzo et al. (1984) indicam a existência de ligação orientada e dependente do tempo das bactérias de *R. trifolii* 403 à superfície dos pêlos radicais do trevo. Quando 10^7 bactérias de *R. trifolii* 403 ou mais foram inoculadas nas plântulas do trevo, observou-se uma rápida formação e ligação de aglomerados bacterianos nas pontas dos pêlos radicais durante os primeiros minutos (Figura 1B: fase 1, período 1A). Após quatro horas, os aglomerados bacterianos permaneceram ligados às pontas dos pêlos radicais, e também foram observadas bactérias individuais ligadas polarmente à superfície dos pêlos radicais (Figura 1B: fase 1, período 1B). Essa última observação foi evidente (após 12 horas da inoculação) por toda a superfície dos pêlos radicais, em relação ao número menor de agregados bacterianos que ficaram restritos às pontas dos pêlos radicais (Figura 1B: fase 1, período 1C). O inóculo com 10^5 a 10^6 bactérias por plântulas não mostrou a formação imediata de aglomerados, porém, após quatro horas, a ligação polar das bactérias à superfície dos pêlos radicais foi observada (Figura 1B: fase 1, período 1C). Essa seqüência de ligação foi: (i) seletiva para *R. trifolii* e detectável para o tamanho de inóculo de 10^7 a 4×10^8 bactérias por plântula; (ii) inibida especificamente pela D-glicose, e (iii) não observada quando 4×10^8

bactérias foram adicionadas para raízes das plântulas de alfafa. O teste de imunofluorescência localizou a “trifolin” na interface da bactérias-pêlo radical. Uma vez ligada a *R. trifolii* à superfície do pêlo radical, a ligação torna-se progressivamente menos suscetível de ser desfeita pela D-glicose (30 mM). A microscopia eletrônica revelou o acúmulo de microfibrilas na interface bactéria-planta após 12 horas da inoculação, resultando uma adesão firme das bactérias à superfície dos pêlos radicais (Figura 1B: fase 2).

Avanços experimentais com plantas transgênicas têm mantido a hipótese de reconhecimento por lectina na simbiose rizóbio-leguminosa com poucas modificações, resistindo ao teste do tempo. Uma vertente da hipótese considera a lectina como molécula ligante que prende o rizóbio à superfície das raízes das plantas até que a produção dos fatores Nod (NF) tome uma dimensão mais ativa na transmissão de sinais para o desenvolvimento da simbiose. Por exemplo, Kijne (1992) propõe que as lectinas podem estar envolvidas na estabilização do citoesqueleto celular pela interação transmembrana, pois quando lectinas da ponta dos pêlos radicais ligam-se aos rizóbios, esses se tornam desestabilizados e um cordão infecção pode ser induzido (Figura 2).

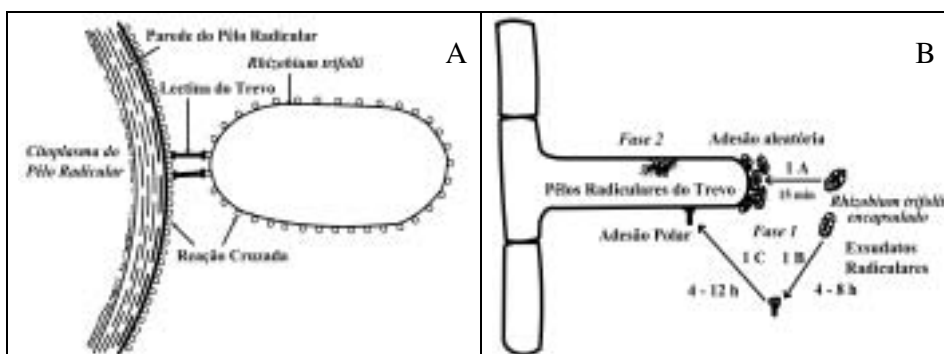


Figura 1: Modelo da ligação cruzada (A) entre *Rhizobium trifolii* e a superfície do pêlo radical, por intermédio da lectina do trevo “trifolin” (Dazzo & Hubbell, 1975) e da seqüência de etapas de ligação (B) (Dazzo et al., 1984).

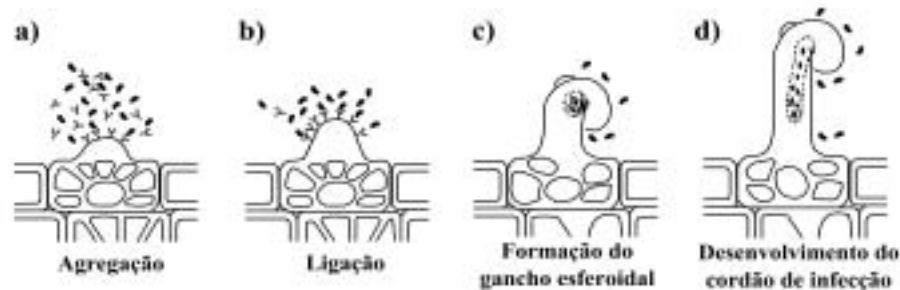


Figura 2: Pressuposição da função da lectina nas plantas transgênicas que expressam gene incorporado de lectina. a) Lectinas (Y) são produzidas a partir do pêlo radical emergente e por ele secretadas, facilitando a agregação dos rizóbios; b) Rizóbios são ligados ao pêlo radical; c) Curvatura do pêlo radical entorna o rizóbio e um cordão de infecção é formado a partir da membrana hialina; d) Alongamento do pêlo radical e aumento do cordão de infecção (Kijne, 1992).

A Figura 3 ilustra outra possibilidade. No pêlo radical não-inoculado (Figura 3A), os receptores dos NF e as lectinas encontram-se distribuídas na superfície das pontas dos pêlos radicais. A adição de moléculas de NF por si só não promove o agrupamento dos receptores dos NF, contudo, induz a outro tipo de deformação dos pêlos radicais e não à sua curvatura (Figura 3B). Na inoculação com o rizóbio, é observado o desenvolvimento da curvatura dos pêlos radicais que entorna as bactérias ligadas (Figura 3C) como resultado do agrupamento das lectinas para uma região da superfície radical (ilha de proteínas), por se ligarem à superfície de polissacarídeo bacteriano. Isso pode levar, também, a uma migração lateral ou formação de cobertura de receptores dos NF específicos produzidos (Figura 3D). O tamanho dessa cobertura definirá a força da transdução do(s) sinal(is) que se sucedem e assim o rizóbio poderá ter acesso ou não ao cordão de infecção em desenvolvimento.

Na outra vertente da hipótese, propõe-se a existência de complexos de lectina com proteína-putativa-transmembrana que estão distribuídos aleatoriamente na superfície dos pêlos radicais (Figura 3e). Quando as raízes são inoculadas com rizóbio, esses complexos agrupam-se pelas ligações do seu domínio lectínico à superfície polissacarídica do rizóbio, transmitindo sinais da nodulação à hospedeira por meio de uma via de

transdução ainda não caracterizada (Figura 3f). Embora os efeitos dos NF na hospedeira possam ser independentes de seus receptores, a ligação dos rizóbios (ou agregados de rizóbios) à superfície das raízes possibilitará uma produção localizada ou pontual de NF que poderá amplificar e garantir os seus efeitos no encurvamento e no crescimento do pêlo radical normal, assim como no desenvolvimento do cordão de infecção e dos nódulos.

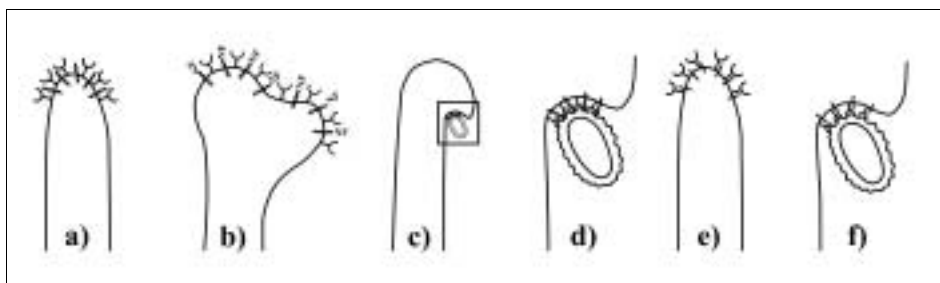


Figura 3: Possíveis modelos que explicam o envolvimento da lectina na formação do cordão de infecção: **Modelo I** - molécula ligante (a-d): a) lectinas (Y) e receptores dos fatores Nod (NF) putativos (≈) são distribuídos aleatoriamente na ponta do pêlo radical não inoculado. b) Caso os fatores NF sejam adicionados, o pêlo radical deforma por causa da ligação dos NF aos receptores, porém esses receptores não se agrupam lateralmente na membrana citoplasmática. c) Na presença de rizóbio, o pêlo radical encurva-se. d) Ampliação da área envolvente do pêlo radical em “c”: as moléculas de lectinas ligam-se às moléculas da superfície do rizóbio, concentrando a fonte de NF. Receptores de NF são saturados pela sua produção localizada. A saturação de receptores ativa a via de transdução de sinais. **Modelo II** - lectinas interagem diretamente com outros componentes (e-f). e) lectinas complexadas com proteínas transmembranas que estão aleatoriamente distribuídas na ponta do pêlo radical não-inoculado. f) quando as lectinas se ligam a polissacarídeos da superfície do rizóbio, as proteínas são agrupadas. Esse evento é dependente de NF porque o cordão de infecção não é formado na ausência deste (Hirsch, 1999).

2 RECEPTORES DE LECTINAS NO RIZÓBIO E NAS RAÍZES DAS PLANTAS

Rizóbios são bactérias Gram-negativas com membranas citoplasmática e externa, separadas por um espaço periplasmático. No mínimo quatro diferentes polissacarídeos são conhecidos para ter importância na simbiose: (i) Glucanos cíclicos, que são principalmente estabelecidos no espaço periplasmático das bactérias e também no

meio de cultivo; (ii) Exopolissacarídeos ligados fracamente à membrana externa ou liberados totalmente no meio extracelular; (iii) Lipopolissacarídeos, que são componentes estruturais da membrana externa; e (iv) Polissacarídeos capsulares, que são usualmente estabelecidos na membrana externa.

Os exopolissacarídeos do rizóbio são conhecidos por serem importantes na formação dos cordões de infecção de algumas das leguminosas (Hirsch, 1999). Contudo, van Workum et al. (1998) mostraram que um número de sítios de infecção em raízes de ervilha foi severamente reduzido quando inoculadas com mutante *R. leguminosarum* bv. *viciae* deficiente de exopolissacarídeos. Os estudos com glucanos cíclicos, lipopolissacarídeos e polissacarídeos capsulares, utilizando mutantes de rizóbio deficientes na produção dessas moléculas, têm dado acesso a resultados que ainda não definem bem a participação dessas moléculas na nodulação das leguminosas. Recentemente, um polissacarídeo de elevada massa molecular foi isolado a partir de *R. leguminosarum* bv. *viciae* RBL552 (Laus et al., 2006). Essa molécula é composta principalmente por glicose, manose e menores quantidades de galactose e ramnose, mostrando uma elevada afinidade para se ligar às lectinas da ervilha e lentilha (*Lens esculenta* Moench). Outros polissacarídeos da superfície produzidos pela estirpe de rizóbio não se ligam a essas lectinas. O uso de lectina marcada indicou que esse polissacarídeo glicose-manose está localizado na superfície polar do rizóbio, envolvida na ligação com a superfície da raiz.

A estrutura geral dos NF (lipoquitina-oligossacarídeos) indica que essas moléculas sinais rizobianas não atuam como ligantes com uma lectina típica de leguminosa, como a da soja (SBA) ou a da ervilha (PSL) (Etzler et al., 1999). Contudo, uma lectina obtida da raiz de *Dolichos biflorus* L. (LNP) liga-se aos NF das estirpes, que nodulam essa leguminosa e possuem uma seqüência de aminoácidos diferente das lectinas de leguminosas até então estudadas. A LNP localizada na superfície dos pêlos radicais possui um domínio enzimático que hidrolisa as ligações fosfo-anidridas dos (di)trifosfatos nucleotídeos e a sua seqüência de aminoácidos contém quatro domínios característicos de

apirases. O tratamento das raízes com anticorpos específicos inibe a habilidade do rizóbio de induzir o encurvamento dos pêlos radicais e a nodulação, sugerindo que essa lectina possui importância no reconhecimento do microssimbionte.

Metcalfe et al. (1983) mostraram que receptores específicos para a SBA estão localizados na membrana plasmática dos protoplastos da soja. A interação de várias lectinas ¹²³I-marcadas foi saturável e específica, com distribuição uniforme na membrana plasmática. Os estudos de fotodegradação (*photobleaching*) indicaram que os complexos lectina-receptor foram móveis. A parcial digestão dos protoplastos da soja com tripsina diminuiu a interação com a SBA, porém não com as outras lectinas. Ridge et al. (1998) detectaram carboidratos na superfície das pontas dos pêlos radicais de quatro leguminosas e em duas não-leguminosas, utilizando lectinas. Uma única lectina (específica para galactose) liga-se às raízes das leguminosas de estreita faixa hospedeira e cinco das dez lectinas utilizadas ligam-se ao siratro (*Macroptilium atropurpureum* L.), uma planta de ampla faixa hospedeira. Os autores deduzem que a ligação das lectinas à superfície das pontas dos pêlos radicais em crescimento deve-se ao domínio de carboidratos das glicoproteínas da membrana. Essa superfície de carboidratos pode estar envolvida nas primeiras interações com o rizóbio, que em siratro por ter muitas formas de carboidratos, além de comportar uma ampla faixa de rizóbios hábeis para a interação simbiótica.

3 ESPECIFICIDADE DA LECTINA DE LEGUMINOSA QUANTO AOS RIZÓBIOS

A especificidade da ligação de lectina de soja aos rizóbios foi estudada por Bhuvaneshwari et al. (1977). A lectina de soja ligou-se a 15 das 22 estirpes de *Rhizobium japonicum* testadas e esta ligação foi dependente do tempo de cultivo. Contudo, a lectina não se ligou à superfície de 7 estirpes de *R. japonicum*, assim como outras estirpes de rizóbio que não nodularam à soja. A ligação com *B. japonicum* mos-

trou ser reversível ou inibida pela galactose, pela N-acetil-galactosamina e por filtrados da cultura de *R. japonicum*. Conforme Wong (1980), há especificidade de ligação das lectinas de lentilha, de ervilha, de fava (*Vicia faba* L.) e do feijão de porco (*Canavalia ensiformis* L., DC.) com as estirpes de rizóbio. A lectina de lentilha liga-se a 3 das 5 estirpes de *R. leguminosarum* testadas, e também à *R. japonicum* 61A133. As lectinas de ervilha e de fava ligam-se apenas a 2 das 5 estirpes de *R. leguminosarum*, contudo, a Concanavalina A (lectina do feijão de porco) liga-se a todas as estirpes de *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. japonicum* e *Rhizobium* sp. testadas. Essas 4 lectinas têm propriedades de ligação similares a sacarídeos, porém diferem nas suas propriedades físicas.

4 LECTINAS DE LEGUMINOSA NOS TECIDOS DA PLANTA

Pueppke et al. (1978) quantificaram os níveis de lectina em vários tecidos das plantas de soja. A lectina da semente foi detectada nos cotilédones, no eixo embrionário e na cobertura das sementes (Figura 4). A lectina da soja esteve presente em todos os tecidos das plântulas jovens, porém, diminuiu conforme avançou o desenvolvimento das plantas até níveis não-detectáveis (plantas de 2 a 3 semanas de idade). No geral, as lectinas são encontradas no vacúolo, na parede celular ou no espaço intercelular das plantas. A distribuição de lectinas específicas ao rizóbio nos tecidos da raiz dá suporte para a hipótese de reconhecimento de lectina na simbiose rizóbio-leguminosa. No amendoim (*Arachis hypogaea* L.), duas lectinas específicas para galactose são acumuladas nos nódulos (VandenBosch et al., 1994). As lectinas foram mais abundantes no parênquima dos nódulos, acumulando-se no vacúolo e na matriz extracelular. Nas células do nódulo infectadas pelo rizóbio, as lectinas foram localizadas no lume do simbiossoma, porém não estavam ligadas aos bacteróides. Segundo Rodríguez-Navarro et al. (2007), as lectinas das pontas dos pêlos radiculares podem ser liberadas na

rizosfera, como resultado do aumento da sua solubilidade sob condições alcalinas do meio. Em contraste, nas condições ácidas (pH 5,6) elas são menos solúveis e retidas nas pontas dos pêlos radicais, favorecendo a ligação do rizóbio à superfície das raízes da planta.

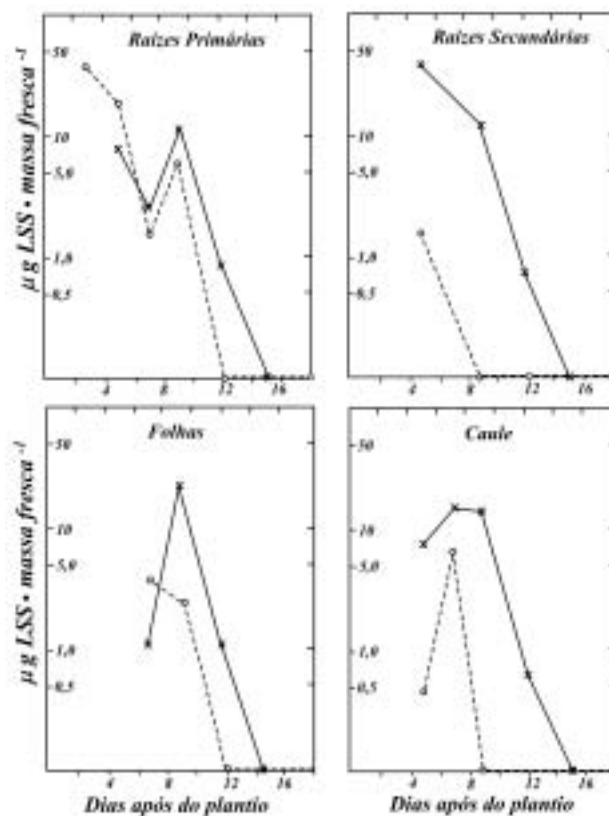


Figura 4: Concentração de lectina (LSS) nas raízes primárias e secundárias, nas folhas e no caule das plantas jovens de soja (*Glycine max* (L) Merr.). Os extratos dos tecidos foram analisados quanto à lectina pelas técnicas de Radioimunoensaio (x-x) de hemaglutinação (o-o). Dados médios de 4 a 9 repetições testadas separadamente (Pueppke et al., 1978).

5 EFEITOS DE LECTINAS NAS BACTÉRIAS

Os efeitos de lectina na fisiologia bacteriana têm sido avaliados. Antonyuk et al., (1997) indicaram que a lectina de germe de trigo *Triticum*

spp. (específica para manose/glicose) promoveu a fixação de N_2 , a excreção de amônio, a atividade da glutamina sintetase e a sínteses de ácido indol-acético em cultura de *Azospirillum brasiliensis*. A lectina hemolinfática de caranguejo *Scylla serrata* Forskal (específica para N-acetil-D-galactosamina) teve atividade antimicrobiana por inibir a respiração e a oxidação da glicose exógena em *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (Majumder et al., 1997). Entretanto, Lau & Chan (1984) informaram que houve um aumento na demanda de O_2 em *B. cereus* sob efeito da lectina Con A (específica para manose/glicose).

As lectinas I (específica para o ácido glucurônico e para a fructose 1,6 difosfato) e II (que se liga também à D-galactosamina e à D-glicosamina), isoladas a partir de *Paenibacillus polymyxa* 1460, inibiram o crescimento do *R. leguminosarum* 252 e do *B. subtilis* 36 a uma concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Karpunina et al., 2003). A lectina I também inibiu o *A. brasilense* 245 e a *Erwinia carotovora* subsp. *citrulis* 603. A lectina II exerceu sua atividade inibitória nas estirpes (B-610 e B-611) de *Xanthomonas campestris* e de (245) *A. brasilense*. Segundo Mel'nikova et al. (2001), a atividade proteolítica associada a essas lectinas foi aumentada ou inibida pelos carboidratos que obstruem a agregação bacteriana. A atividade proteolítica da lectina II apresentou maior inibição, com o ácido glucurônico e a fructose 1,6 difosfato, do que da lectina I. Esse efeito inibitório foi mais acentuado quando ambos os carboidratos foram misturados. Entretanto, na lectina II, a D-galactosamina e a D-glicosamina elevaram a atividade proteolítica, respectivamente, na ordem de duas e dez vezes. Segundo os autores, a modulação da atividade proteolítica no *P. polymyxa* 1460 mostra especificidade ao carboidrato ligado (ou superfície celular) sugerindo uma função mais ativa dessas lectinas.

O efeito das lectinas de sementes de leguminosas, com especificidade para glicose (*Canavalia brasiliensis* Benth. – ConBr e *Cratylia floribunda* Benth – CFL) e para glicídios galactosídico (*Vatairea macrocarpa* Benth. Ducke. – VML e *Phaseolus vulgaris* L. – PHA), foi avaliada em suspensões de rizóbio. Todas essas lectinas induziram à agregação de bactérias de *R. tropici* CIAT 899, *R. etli* CFN42 e *R.*

leguminosarum bv. *phaseoli* USDA 2671 (Martínez et al., 2005). As lectinas com especificidade para galactose mostraram maior afinidade pelas superfícies dos rizóbios quanto à capacidade aglutinante. Martínez et al. (2004a) mostraram que a VML (20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), com alta afinidade pela superfície do rizóbio, estimulou fortemente a demanda de O₂ em suspensões da CIAT 899 (Figura 5D) e da CFN42, assim como o efluxo de H⁺ e de Na⁺ na CIAT 899 (Martínez et al., 2004b), indicando alteração da bioenergética bacteriana. Esse estímulo foi observado com no mínimo 6200 moléculas de VML por bactéria. As lectinas ConBr, CFL e PHA não estimularam a demanda de O₂ da CIAT 899 (Figura 5A, B e C). A VML é uma glicoproteína, que foi isolada por cromatografia de afinidade com goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba* [L.] Taub.), e se apresenta como dímero (≈ 70 kDa) em pH neutro, mais tetrâmeros e grandes agregados podem estar também presentes (Cavada et al., 1998).

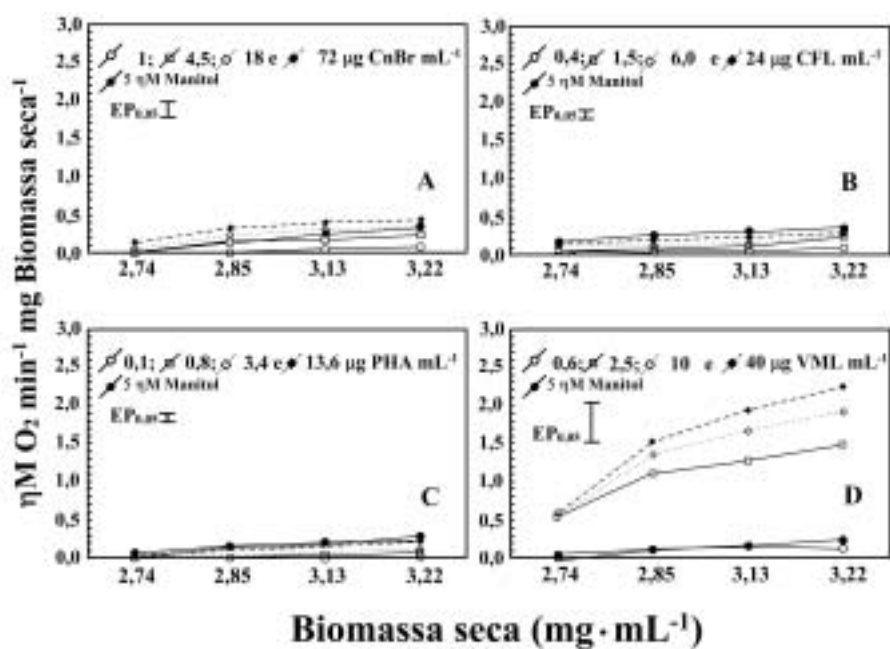


Figura 5: Demanda específica de O₂ das suspensões de *R. tropici* CIAT 899 sob influência da densidade bacteriana ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e concentração de lectina (μg lectina $\cdot \text{mL}^{-1}$). Influência do tipo de lectinas: (A) *Canavalia brasiliensis*-CnBr, (B) *Cratylia floribunda*-CFL, (C) *Phaseolus vulgaris*-PHA and (D) *Vatairea macrocarpa*-VML. Média de três repetições e erro-padrão (EP) para $P < 0,05$. Manitol (5 nM): nutriente de referência (Martínez et al., 2004b).

6 EFEITOS DE LECTINA NA INFECÇÃO DA HOSPEDEIRA PELO RIZÓBIO

O envolvimento das lectinas de sementes na interação *Rhizobium etli*-feijoeiro tem sido estudado por Brelles-Marino et al. (1996). Pré-tratamento de *R. etli* com lectinas das cultivares Alubia e BAT76 mostrou efeitos significativos no número de cordões de infecções nas raízes desses cultivares. Entretanto, não houve correlação significativa com o aumento do número de nódulos. Segundo os autores, as lectinas podem ter aumentado a afinidade do rizóbio pela superfície das raízes da hospedeira e, conseqüentemente, também melhorado a habilidade das bactérias para penetrarem nas raízes. Outro tipo de resposta fisiológica na *R. etli*, além da etapa de ligação bacteriana, não pode ser excluída.

Mestrallet et al. (1999), estudando o efeito da adição de lectina da PHA nas características da simbiose rizóbio-feijoeiro, verificaram que o pré-tratamento do rizóbio, por 3 horas, foi suficiente para induzir mudanças fisiológicas nas bactérias, necessárias para obter uma infecção precoce no feijoeiro. O efeito de precocidade da infecção do feijoeiro foi, significativamente, avaliado pelo maior tamanho dos nódulos, pela produção da matéria seca e pelo nitrogênio acumulado nos tratamentos com rizóbio ou com as raízes de plantas pré-tratadas, separadamente, com a PHA. Lodeiro et al. (2000) mostraram que o pré-tratamento (6-12 h) de *B. japonicum* com lectinas SBA ($660 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) estimulou a ligação (50%) das bactérias à superfície das raízes da hospedeira. Essa atividade foi observada com no mínimo 1000 moléculas de SBA por bactéria e resultou no aumento da infecção e da nodulação na soja pelo *B. japonicum* pré-tratado com SBA purificada, como também com o extrato das sementes da soja.

7 AMPLIAÇÃO DA FAIXA HOSPEDEIRA PELA TRANSFERÊNCIA DOS GENES DE LECTINAS

A tecnologia de plantas transgênicas vem oferecendo melhores aproximações e mantendo a hipótese do reconhecimento, mediado por

lectina, na simbiose rizóbio-leguminosa. A introdução do gene *psl* (lectina da ervilha) em trevo permitiu que as raízes da transgênica expressassem a PSL e que o *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, um simbionte de ervilha que não nodula o trevo, encurvasse e infectasse os pêlos radicais do trevo, conferindo-lhe a capacidade de ser nodulada (pseudonódulos) pelo simbionte da ervilha (Díaz et al., 1989). A substituição de um resíduo de aminoácido (no ambiente receptor da lectina que liga ao monossacarídeo) na PSL resultou na perda da função ligante (van Eijsden et al., 1995). A introdução do gene mutante no trevo originou incapacidade das raízes de formarem pseudonódulos quando inoculados com bv. *viciae*. Entretanto, a nodulação com o simbionte bv. *trifolii* foi normal, sugerindo que a capacidade da PSL de se ligar ao monossacarídeo é necessária para a infecção da bv. *viciae*. De forma similar, raízes transgênicas de *Lotus corniculatus* L., expressando a SBA, ganharam capacidade para ser nodulada ineficientemente por *Bradyrhizobium japonicum* (van Rhijn et al., 1998). Esses resultados indicam que, embora a produção e o reconhecimento dos NF sejam considerados determinantes na especificidade hospedeira, o processo de reconhecimento mediado por lectinas também tem um importante significado na interação rizóbio-leguminosa.

Entretanto, van Rhijn et al. (1998) enfatizaram que a estreita relação entre *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *R. leguminosarum* bv. *viciae* torna difícil extrapolar esses resultados para outras interações rizóbio-leguminosas. Esses experimentos foram ampliados para a soja e a *L. corniculatus*, duas leguminosas pobremente relacionadas. O gene *le1*, responsável pela síntese da SBA, foi transferido para *L. corniculatus*, que é normalmente nodulada pelo *Mesorhizobium loti*. Nos experimentos com a transgênica *L. corniculatus* observou-se que a SBA se expressou nos pêlos radicais emergentes e que os pseudonódulos (semelhantes aos nódulos induzidos pelo *M. loti*) foram formados nas raízes da transgênica, inoculadas com *B. japonicum*. Entretanto, as células dos pseudonódulos mostraram-se desprovidas de *Bradyrhizobium*, possivelmente por causa do desenvolvimento incompleto dos cordões de infecção. O cultivo de *B. japonicum* com "genistein" (flavonóide da soja)

aumentou o número de pseudonódulos, sugerindo que um componente do exopolissacarídeo da superfície bacteriana e, talvez, dos NF, sejam requeridos na ampliação da faixa hospedeira da *L. corniculatus* transgênica.

A interação de lectina de leguminosa com rizóbio foi estudada em plantas transgênicas de arroz – *Oryza sativa* L. (Sreevidya et al., 2005). As expressões da PSL e da GS52-LNP (LNP da *Dolichos biflorus* L. e da soja, respectivamente) promoveram uma significativa colonização das raízes do arroz pelo rizóbio. Isso indicou que a PSL e GS52-LNP, respectivamente, participam no reconhecimento do rizóbio em ervilha e em soja e são, também, igualmente hábeis para desempenhar similar função nas plantas transgênicas de arroz. Ressalta-se que, em leguminosas, a PSL e GS52-LNP mediarão a agregação e as ligações dos rizóbios para as pontas dos pêlos radicais. A expressão da GS52-LNP em arroz também promove a proliferação e o crescimento das raízes laterais (55% em relação ao tratamento controle) quando inoculados com rizóbio, indicando que a atividade da apirase GS52-LNP pode melhorar o crescimento do arroz pelo efeito no metabolismo do fosfato. Esses estudos não demonstraram unicamente que a faixa hospedeira nas simbioses rizóbio-leguminosa é, no mínimo, parcialmente determinada pela interação lectina de raiz com rizóbio, porém, também reforça a idéia de que a faixa hospedeira poderá ser ampliada pela transferência dos genes de lectinas relativos à simbiose para leguminosas heterólogas.

8 EFEITOS DA LECTINA NA EFICIÊNCIA DA SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA

Alguns trabalhos mostram que o tratamento de rizóbio com uma lectina isolada, a partir da planta hospedeira, estimula sua habilidade competitiva e de infecção, como também aumenta a atividade de fixação do nitrogênio nos nódulos radicais, que presume-se ser devida à influência da lectina na biossíntese da nitrogenase na célula bacteriana. Como resultado da pré-incubação do rizóbio com lectinas homólogas, houve um estímulo no crescimento das plantas e um aumento da produ-

tividade da simbiose. Entretanto, o modelo desse efeito da lectina depende da sua concentração na suspensão bacteriana. Kirichenko & Titova (2006) e Sytnikov et al. (2007a) mostraram que a inoculação com estirpe efetiva 634b de *B. japonicum*, pré-incubada com lectina da soja (50 mg · mL⁻¹), estimulou significativamente a massa fresca (58%) e o número (110%) de nódulos, a atividade da nitrogenase (66%), a produção de matéria seca da parte aérea (31%) e a produção de grãos (8%) das plantas de soja da cultivar "Mar'yana". De modo semelhante, Sytnikov et al. (2007a) detectaram o aumento significativo (25%) na atividade fotossintética da cultivar "Mar'yana", entretanto, a pré-incubação da 634b com lectina da ervilha não mostrou efeito nessas variáveis avaliadas.

Posteriormente, Sytnikov et al. (2007b) avaliaram o efeito da lectina de semente da soja na eficiência dos inoculantes líquido e sólido na simbiose da soja (cultivar Mar'yana), com *B. japonicum* 634b (Tabela 1). Os experimentos foram realizados em nível de campo em dois tipos de solo. Em ambos solos, a lectina (100 µg · mL⁻¹) aumentou significativamente o número e a massa de nódulos, a atividade da nitrogenase, a produção de matéria das raízes e da parte aérea das plantas de soja. O inoculante sólido com lectina teve melhor desempenho nessas variáveis. O efeito da lectina foi observado em nível de rendimentos de grãos da cultivar Mar'yana que mostrou ser 25% maior (3,12 a 4,12 Mg · ha⁻¹) que a produção dos tratamentos controles sem lectinas (2,81 a 3,31 Mg · ha⁻¹), em ambos os tipos de solos.

Tabela 1 – Efeito da lectina de semente da soja na eficiência dos inoculantes líquido e sólido de *Bradyrhizobium japonicum* 634b nas plantas da cultivar Mar'yana de soja¹ (*Glycine max* (L.) Merr.) (Sytnikov et al., 2007b)

Concentração de Lectina	Nodulação		ARA ²	Produção Grãos
	Número	Massa		
$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Nod $\cdot \text{pl}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{pl}^{-1}$	$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{h} \cdot \text{pl})^{-1}$	$\text{Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$
Inoculante Líquido				
0	24.5 ± 2.0	0.9 ± 0.1	38.0 ± 1.4	2.81 ± 0.15
100	39.0 ± 3.1	1.5 ± 0.2	42.1 ± 3.5	3.52 ± 0.12
300	28.3 ± 3.0	0.9 ± 0.1	38.5 ± 3.7	3.15 ± 0.21
Inoculante Sólido				
0	26.0 ± 1.7	0.9 ± 0.1	38.3 ± 0.8	3.31 ± 0.18
100	40.3 ± 4.4	1.8 ± 0.1	45.0 ± 4.6	4.12 ± 0.08
300	35.2 ± 3.5	1.0 ± 0.2	38.8 ± 0.5	3.88 ± 0.20

¹ Experimento foi realizado em campo. ² Atividade de redução do acetileno. Os dados são médias de 4 repetições. As avaliações da nodulação e ARA foram feitas nas plantas para o estágio de florescimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das evidências diretas e indiretas, informadas na literatura, que indicam a lectina como a mediadora da interação rizóbio-leguminosa, ainda há necessidade de maiores esclarecimentos. A busca dessas respostas permitirá visualizar novas oportunidades e, assim, delinear estratégias de cunho genético, proteômico e/ou de biologia celular para uma melhor abordagem, que permitam conhecer os mecanismos e as possíveis funções dessa mediação, definindo assim a importância e o potencial biotecnológico das lectinas.

Os estudos em nível molecular têm sido usados para decifrar as interações genéticas complexas que envolvem essas relações endossimbióticas planta-microrganismo. A análise dos genes transcritos, das proteínas e dos metabólitos, têm sido aplicados para a simbiose micorrízica (Guttenberguer & Hampp, 1992) e rizobial (Guerreiro et al., 1997; Natera et al., 2000; Wan et al., 2005; van Noorden et al., 2007), e para o desenvolvimento de ferramentas moleculares conhecidas como: i)

plantas e microrganismos mutantes; ii) ESTs (*expressed sequence tag*) disponíveis, especialmente, a partir de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen, *Medicago truncatula* Gaertn. e de soja, entre outras; e, ainda, iv) a disponibilidade das seqüências genômicas completas dos microsimbiontes *Mezorhizobium loti* e *Sinorhizobium meliloti*. Todas essas ferramentas têm extensamente contribuído para o conhecimento dessas relações endossimbióticas.

A aplicação da proteômica para a simbiose das leguminosas com o rizóbio é um fenômeno relativamente recente e pode catalisar o conhecimento desse sistema. Embora em 1992 Krause & Broughton tenham analisado as proteínas associadas com o início do processo da nodulação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., os avanços tecnológicos incorporados na proteômica, durante uma década, habilitaram Natera et al. (2000) a examinarem o proteoma em eletroforese bidimensional (2-D) com precisão e, assim, identificarem proteínas com expressão diferenciada, envolvidas na interação simbiótica entre *Sinorhizobium meliloti* 1021 e *Melilotus alba* Ledeb. Nesse estudo, foi mostrado que mais de 250 proteínas são promovidas nos nódulos, em comparação com o proteoma expresso no tecido da raiz, e mais de 350 proteínas são suprimidas nos bacteróides com relação às proteínas expressas nas bactérias que crescem sob condições de meio de cultivo. Essas proteínas estão envolvidas nos metabolismos do nitrogênio, do carbono e, também, no processo de divisão celular, entre outras. Uma lista que representa um bom ponto para o início de uma investigação baseada em proteômica funcional.

Ressaltamos que o principal problema na análise proteômica é a obtenção de modelos experimentais estáveis e reproduzíveis, que possam oferecer uma padronização de condições de cultivo e dos procedimentos de extração. Obtido isto, o emprego da eletroforese 2-D, para dissecar o proteoma, tem sido utilizada com sucesso para estabelecer os mapas-padrão de proteínas das células, dos tecidos e dos modelos de desenvolvimento (van Wijk, 2001) em situações normais, e permite também a sua comparação com os produtos protéicos produzidos quando esses sistemas biológicos são expostos a diferentes condições bióticas e ambientais. Muitas proteínas são detectadas nesses mapas (ou nas

comparações dos mapas) e podem ter sua identidade aproximada por seqüenciamento da terminação N e por espectrometria de massa (MALDI-Tof), em combinação com ferramentas de bioinformática (Natera et al., 2000). Testes bioquímicos ou moleculares deverão ser realizados para a comprovação *in situ* da existência da proteína identificada. Nesse sentido, a análise comparativa dos proteomas dos pêlos radicais da soja possibilitou a identificação de 27 proteínas candidatas que são expressas nos pêlos radicais e não nas células do tecido da raiz e, entre essas, a expressão de várias proteínas são promovidas pela inoculação com *B. japonicum*, como a indução significativa da SBA no período de 18 h após a inoculação (Wan et al., 2005). Contudo, novas proteínas foram também identificadas. Van Noorden et al. (2007) mostraram mudanças do proteoma das raízes de *M. truncatula* Gaertn. em resposta ao tratamento com auxina e à inoculação com *S. meliloti*. Nesse estudo foram identificadas, na iniciação dos nódulos, a expressão de 131 proteínas que são promovidas pela inoculação com *S. meliloti* e/ou pelo tratamento com auxina.

Embora a análise diferencial de proteoma tenha sido utilizada nos estudos de interações simbióticas entre microrganismo-planta, ainda não foram verificados nos estudos direcionados para as interações rizóbio-lectina, lectina-planta e/ou rizóbio-lectina-planta. A complexidade da nodulação é enorme e isto amplia as oportunidades para estudos mais focalizados.

REFERÊNCIAS

Antonyuk LP, Fomina OR & Ignatov VV 1997 Effect of wheat lectin on the metabolism of *Azospirillum brasilense*: Induction of protein synthesis. *Microbiology*, 66, p. 140-45.

Bhuvaneshwari TV, Pueppke SG & Bauer WD 1977 Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to rhizobia. *Plant Physiol.* 60, p. 486-91.

Bohloul BB & Schmidt EL 1974 Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-Legumes root nodule symbiosis. *Science*. 185, p. 269-71.

Brelles-Mariño G, Costa GA & Boiardi JL 1996 Enhancement of infection thread formation by *Rhizobium etli* incubated with bean seed lectin. *Microbiol. Res.* 151, p. 243-46.

Brewin NJ & Kardansky IV 1997 Legume lectins and nodulation by *Rhizobium*. *Trends Plant Sci.* 2, p. 92-98.

Cavada BS, Santos CF, Grangeiro TB, Nunes EP, Sales PVP, Ramos RL, De Sousa FAM, Crisostomo CV & Calvete JJ 1998 Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*. 49, p. 675-80.

Dazzo FB & Hubbell DH 1975 Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Appl. Microbiol.* 30, p. 1017-33.

Dazzo FB, Napoli CA & Hubbell DH 1976 Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, p. 166-71.

Dazzo FB, Truchet GL, Sherwood JE, Hrabak EM, Abe M & Pankratz SH 1984 Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, p. 1140-50.

Dazzo FB, Yanke WE & Brill WJ 1978 Trifoliin: a *Rhizobium* recognition protein from white clover. *Biochim. Biophys. Acta.* 539, p. 276-86.

Díaz CL, Melchers LS, Hooykaas PJJ, Lugtenberg BJJ & Kijne JW 1989 Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*. 338, p. 579-81.

Etzler ME 1985 Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 36, p. 209-34.

Etzler ME, Kalsi G, Ewing NN, Roberts NJ, Day RB & Murphy JB 1999 A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, p. 5856-61.

Guerreiro N, Redmond JW, Rolfe BG & Djordjevic MA 1997 New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. *MPMI*. 10, p. 506-16.

Guttenberger M & Hampp R 1992 Ectomycorrhizins – symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas? *Planta*. 188, p. 129-36.

Hirsch AM 1999 Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, p. 320-26.

Hirsch AM, Brill LM, Lim PO, Scambray J & van Rhijn P 1995 Step toward defining the role of lectins in nodule development in legumes. *Symbiosis*. 19, p. 155-73.

Karpunina LV, Mel'nikova UYu, Suslova YuV, Mukhacheva ES & Ignatov VV 2003 The bactericidal activity of lectins from nitrogen-fixing bacilli. *Microbiology*. 72, p. 300-304.

Kijne JW 1992 The *Rhizobium* infection process. In *Biological Nitrogen Fixation*, Ed. by G Stacey, R Burris, H Evans. p 349-98. New York: Chapman and Hall.

Kijne JW, Bauchrowitz MA & Díaz CL 1997 Root lectins and rhizobia. *Plant Physiol.* 115, p. 869-73.

Kirichenko EV & Titova LV 2006 Soybean lectin as a component of a composite biopreparation involving *Bradyrhizobium japonicum* 634b. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42, p. 195-199.

Krause A & Broughton WJ 1992 Proteins associated with root-hair deformation and nodule initiation in *Vigna unguiculata*. *MPMI.* 5, p. 96-103.

Lau TM & Chan KY 1984 Physiological responses of *Bacillus* species to concanavalin A. 2. Effect on growth, oxygen uptake, enzyme activities and intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate level of *B. cereus* ATCC 14579. *Microbios.* 39, p. 137-50.

Laus MC & Kijne JW 2004 A Fixer's Dress Code: Surface polysaccharides and host-plant-specificity in the root nodule symbiosis. *Trends Glycosci. Glyc.* 16, p. 281-90.

Laus MC, Logman TJ, Lamers GE, van Brusel AAN, Carlson R & Kijne JW 2006 A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microbiol.* 59, p. 1704-13.

Lodeiro AR & Favelukes G 1999 Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots specificity in the process of adsorption. *Soil Biol. Biochem.* 31, p. 1405-11.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J & Wyns L 1998 Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta.* 1383, p. 9-36.

Majumder M, Chattopadhyay T, Guha AK & Chatterjee BP 1997 Inhibition of bacterial respiration by a low-molecular weight lectin, Scyllin, from *Scylla serrata* crab hemolymph. *Indian J. Biochem. Biophys.* 34, p. 87-89.

Martínez CR, Albertini AVP, Figueiredo MVB, Silva VL, Sampaio AH, Cavada BS & Lima-Filho JL 2004a Respiratory stimulus in *Rhizobium* sp. by legume lectins. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, p. 77-83.

Martínez CR, Chanway CP, Albertini AVP, Figueiredo MVB, Sampaio AH, Castellon RR, Cavada BS, Lima-Filho JL 2004b The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: net H⁺ efflux stimulus and alteration of extracellular Na⁺ concentration. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, p. 17-22.

Martínez CR, Netto AN, Figueiredo MVB, Cavada BS & Lima-Filho, JL 2005 Kinetic sedimentation of *Rhizobium*-aggregates produced by leguminous lectins. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, p. 75-82.

Mel'nikova UYu, Karpunina LV, Ostakhina NV & Ignatov VV 2001 Proteolytic Activity of Lectins from the Nitrogen-Fixing Bacterium *Bacillus polymyxa*. *Microbiology.* 70, p. 217-20.

Mestrallet MG, Defilpo SS & Abril A 1999 Efecto de la adición de lectina específica sobre la simbiosis *Rhizobium leguminosarum-Phaseolus vulgaris*. *Rev. Argent. Microbiol.* 31, p. 72-77.

Metcalf TN, Wang JL, Schubert KR & Schindler M 1983 Lectin receptors on the plasma membrane of soybean cells. Binding and lateral diffusion of lectin. *Biochemistry.* 22, p. 3969-75.

Napoli C, Dazzo F & Hubbell DH 1975 Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. *Appl. Microbiol.* 30, p. 123-32.

Natera SHA, Guerreiro N & Djordjevic MA 2000 Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *MPMI.* 13, p. 995-1009.

Pueppke SG, Bauer WD, Keegstra K & Ferguson AL 1978 Role of lectins in plant-microorganism interactions ii. Distribution of soybean lectin in tissues of *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Physiol.* 61, p. 779-784.

Ridge RW, Kim R & Yoshida F 1998 The diversity of lectin-detectable sugar residues on root hair tips of selected legumes correlates with the diversity of their host ranges for rhizobia. *Protoplasma.* 202, p. 84-90.

Rodríguez-Navarro DN, Dardanelli MS & Ruíz-Saínz JE 2007 Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 72, p. 127-36.

Sreevidya VS, Hernandez-Oane RJ, So RB, Sullia SB, Stacey G, Ladha JK & Reddy PM 2005 Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs52* promotes rhizobial colonization of roots in Rice. *Plant Sci.* 169, p. 726-736.

Sytnikov DM, Kirizii DA, Malichenko SM & Kots SYa 2007a Productivity of soybean-*Rhizobium* symbiosis after modification of root nodule bacteria activity with exogenous proteins. *Russ. J. Plant Physiol.* 54, p. 366-372.

Sytnikov DM, Kots SYa & Datsenko VK 2007b Efficacy of biological preparations of soybean root nodule bacteria modified with a homologous lectin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, p. 274-279.

van Eijsden RR, Díaz CL, Pater BS de & Kijne JW 1995 Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Mol. Biol.* 29, p. 431-39.

van Noorden GE, Kerim T, Goffard N, Wiblin R, Pellerone FI, Rolfe BG & Mathesius U 2007 Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 144, p. 1115-31.

van Rhijn P, Goldberg RB & Hirsch AM 1998 *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell*, 10, p. 1233-49.

van Wijk KJ 2001 Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol.* 126, p. 501-8.

van Workum WAT, van Slageren S, van Brussel AAN & Kijne JW 1998 Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific

molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, p. 1233-41.

VandenBosch KA, Rodgers LR, Sherrier DJ & Kishinevsky BD 1994 A peanut nodule lectin in infected cells and in vacuoles and the extracellular matrix of nodule parenchyma. *Plant Physiol.* 104, p. 327-37.

Vijayan M & Chandra N 1999 Lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, p. 707-14.

Wan J, Torres M, Ganapathy A, Thelen J, DaGue BB, Xu BMD & Stacey G 2005 Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. *MPMI.* 18, p. 458-467.

Wong P 1980 Interactions between rhizobia and lectins of lentil, pea, broad bean, and jackbean. *Plant Physiol.* 65, p. 1049-52.

