

Inhibición de la Actividad Hemaglutinante de Algunas Macroalgas Marinas de las Costas de México

Inhibition of hemagglutination activity of some marine macroalgae from the mexican coasts

Graciela De Lara-Isassi* y Sergio Álvarez-Hernández*

RESUMEN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que unen selectivamente azúcares. La inhibición del efecto aglutinante se ha utilizado como criterio de detección para estas moléculas. Se realizaron pruebas de aglutinación con eritrocitos humanos de los tipos O, A y B positivos probando como aglutinantes extractos de 44 muestras algales que correspondieron a 32 especies. Cuatro especies algales mostraron actividad hemaglutinante evidente: 3 de la División Chlorophyta *Codium giraffa* Silva, *Codium isthmocladum* Vickers y *Ulva lactuca* Linnaeus y en una especie de la División Rhodophyta *Hypnea spinella* (C. Ag.) Kützinger. Se reporta inhibición de la actividad aglutinante en *Codium giraffa*, *Codium isthmocladum* y *Ulva lactuca* debida a N-acetilglucosamina. No se observó inhibición en la actividad de *H. spinella* por ninguno de los azúcares utilizados en este estudio.

Palabras clave: lectinas algales, inhibición, hemaglutinación

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins that selective bind sugars. The inhibition of hemagglutination activity has been used as a detection probe for this molecules. Agglutination assays were done with human erythrocytes O, A and B positive groups, testing 44 algal extracts (32 species) as agglutinants. Four extracts showed evident agglutination, 3 Chlorophyta: *Codium giraffa* Silva, *Codium isthmocladum* Vickers and *Ulva lactuca* Linnaeus, one Rhodophyta *Hypnea spinella* (C. Ag.) Kützinger. The inhibition of hemagglutinat activity in *Codium giraffa*, *Codium isthmocladum* y *Ulva lactuca* were due to N-acetylglucosamine. No inhibition was observed by none of the sugars used in this work for *Hypnea spinella* extract.

Key words: algal lectins, inhibition, hemagglutination.

Introducción

Las lectinas son proteínas que han sido investigadas debido a sus propiedades químicas y bioquímicas, que las hace sustancias útiles para el estudio de las funciones biológicas en animales. Principalmente se han estudiado estas moléculas en Angiospermas de la Familia Leguminosae además de otras Familias de plantas terrestres (Lis y Sharon, 1981). Las lectinas han

*Laboratorio de Ficología Aplicada. Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Apartado Postal 55-535, México, D.F., 09340.

sido usadas en la tipificación de grupos sanguíneos; estudios del valor nutricional de los alimentos para animales; estudios de la constitución cromosómica de las células y detección de anormalidades cromosómicas; investigación de la arquitectura de superficies celulares y del cambio que sufren debido a la transformación por cancer; aislamiento, purificación y estudios estructurales de polímeros que contienen carbohidratos; modelos de las reacciones antígeno-anticuerpo, y debido a su capacidad de unir azúcares, en los estudios de sitios de unión específica sobre proteínas (Sharon y Lis, 1972).

La prueba para corroborar la presencia de lectinas consiste en inhibir el efecto hemaglutinante al añadir azúcares simples (monosacáridos, disacáridos y/o sus derivados), o bien, glicoproteínas o polisacáridos de tipo complejo (Lis y Sharon, 1986).

El primer trabajo realizado con el propósito de detectar la presencia de sustancias aglutinantes de eritrocitos humanos en algas, lo realizaron Boyd y colaboradores en 1966 donde reportaron las propiedades hemaglutinantes de extractos de algas de Puerto Rico, encontrando que 9 de 20 especies aglutinaron los eritrocitos de los grupos sanguíneos O, A y/o B. Varios investigadores han destacado la presencia de aglutininas en las macroalgas marinas (Boyd *et al.*, 1966; Blunden *et al.*, 1975; Hori *et al.*, 1981 y 1988a; Fabregas *et al.*, 1984, 1985 y 1986; Muñoz *et al.*, 1985 y 1987c) y se ha demostrado que son capaces de aglutinar eritrocitos de animales, incluyendo los humanos.

No obstante que se ha mostrado una amplia presencia de lectinas entre las algas marinas (Blunden *et al.*, 1975; Hori *et al.*, 1981 y 1988a; Fabregas *et al.*, 1984) éstas han recibido poca atención. Se han investigado aplicaciones de lectinas algales sobre la especificidad en la aglutinación de los grupos sanguíneos encontrándose que la lectina del alga *Ptilota plumosa* aglutinó específicamente los eritrocitos tipo B (Rogers *et al.*, 1977) y el extracto de *Giffordia granulosa* aglutinó al tipo O (Fabregas *et al.*, 1986). Se han analizado las propiedades mitógenas para linfocitos esplénicos de ratón de la lectina carnina aislada de la Rhodophyta *Carpopeltis flabellata* por Hori *et al.* (1987) los que encontraron respuesta mitogénica específica para linfocitos T. También se ha trabajado sobre la posibilidad de uso de lectinas algales para separar subespecies de peces debido a la aglutinación diferencial que presentan los eritrocitos ante estas proteínas (Muñoz *et al.*, 1987a. y 1987b).

Hasta la fecha se han aislado y parcialmente caracterizado las lectinas de 14 algas rojas: *Agardhiella tenera* Schmitz (Shiomi *et al.*, 1979), *Carpopeltis flabellata* (Holmes) Okamura (Hori *et al.*, 1987), *Cystoclonium purpureum* (Huds.) Batt. (Kamiya *et al.*, 1980), *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Chiles and Bird, 1990), *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss (Shiomi *et al.*, 1981), *Griffithsia flocculosa* (Ellis) Batt. (Rogers y Galander, 1988), *Hypnea japonica* Tanaka (Hori *et al.*, 1986b), *Palmaria palmata* (Linnaeus) O. Kuntze (Kamiya *et al.*, 1982), *Plumaria elegans* (Bonnem.) Schmitz (Rogers *et al.*, 1990), *Ptilota plumosa* (Huds.) C. Agardh (Rogers *et al.*, 1977), *Ptilota serrata* Kützing, (Rogers *et al.*, 1990),

Serraticardia maxima (Yendo) Silva (Shiomi *et al.*, 1980), *Soliera chordalis* (C. Ag.) J. Agardh (Rogers y Topliss, 1983), *Soliera robusta* (Greville) Kylin (Hori *et al.*, 1988b). Sólo se ha encontrado una lectina en el alga *Fucus vesiculosus* Linnaeus de la División Pheophyta (Ferreiros y Criado, 1983) y para algas verdes: *Boodlea coacta* (Dickie) Murray *et De Toni* (Hori *et al.*, 1986a), *Codium fragile* (Sur.) Hariot var. *atlanticum* (Cotton) Silva y var. *tomentosoides* (Goor) Silva (Rogers *et al.*, 1986) y *Codium tomentosum* (Huds.) Stack (Fabregas *et al.*, 1988a).

El presente estudio pretende realizar una contribución al conocimiento de la presencia de lectinas en macroalgas marina mexicanas, con el propósito de detectarlas y continuar con estudios sobre aislamiento, caracterización, posible aplicación y uso de estas moléculas.

Material y métodos

Se colectó el material ficológico en la zona intermareal de varias localidades de las costas mexicanas, se lavó el material con agua de mar para reducir al mínimo la contaminación por epífitos y se congeló, utilizando CO₂ sólido, para transportarlo al laboratorio. En el laboratorio se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, se lavaron con agua potable y se limpiaron manualmente de epibiontes. En un mortero se homogeneizaron 10 g de material algal con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 (Stoll y Blanchard, 1990), el homogenado se centrifugó a 1 000 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se pasó por tres capas de gasa para retener el material particulado y finalmente se filtró utilizando un equipo Milipore® con filtro de nitrocelulosa de 22-µm. Los extractos se congelaron a -20 °C hasta su utilización (Muñoz *et al.*, 1985).

El ensayo de hemaglutinación se realizó utilizando una suspensión al 2 % de eritrocitos de los tipos sanguíneos O, A y B positivos, lavando tres veces un volumen de sangre con PBS, centrifugando a 1 000 x g por 10 minutos y diluyendo el paquete celular con 49 volúmenes de PBS. Las pruebas de aglutinación se realizaron en placas de microtitulación, agregando 100 ml de PBS a todos los pozos, 100 ml de extracto algal al segundo pozo, realizando diluciones dobles seriadas y finalmente se agregaron 100 ml de solución de eritrocitos de cada uno de los diferentes tipos de sangre. Las placas se agitaron ligeramente durante 15 segundos y se dejaron reposar durante 1 hora a

temperatura ambiente antes de examinarlas macroscópicamente y bajo el microscopio óptico. Los resultados se expresaron en forma de título, como el recíproco de la máxima dilución que aglutinó a los eritrocitos.

Las pruebas de inhibición de aglutinación se realizaron con los extractos algales que aglutinaron positivamente los eritrocitos, agregando 50 ml de solución 250-mM de los siguientes azúcares: D-Glucosa, D-Manosa, D-Galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetil-manosamina, N-acetil-galactosamina y ácido N-acetil-neuramínico, realizando diluciones dobles seriadas; seguidamente se añadieron 50 ml de extracto algal esperando 15 minutos y finalmente 50 ml de solución de eritrocitos al 2%. Después de una hora a temperatura ambiente se observaron los resultados. Los resultados se expresaron como la mínima concentración milimolar de azúcar que inhibió la unión de la lectina a los determinantes antigénicos de los eritrocitos.

Resultados

En la tabla 1, se observan los resultados de los ensayos de aglutinación de 32 especies (44 muestras). No se encontró diferencia en el título de aglutinación de ninguna de las réplicas, por lo que se reporta solamente el resultado. El extracto del alga *Codium giraffa* presentó actividad contra los tres tipos sanguíneos con un título de 2^7 (1:128 diluciones). La máxima aglutinación la presentaron los extractos de las algas *Ulva lactuca* e *Hypnea spinella*, ambas contra el tipo sanguíneo O positivo con un título de 2^8 ; la actividad hemaglutinante de estas dos especies disminuyó contra los tipos sanguíneos A y B positivos. Para la primera especie las diluciones encontradas como positivas fueron de 2^3 (1:8) y 2^1 (1:2) respectivamente, mientras que para la segunda fueron 2^7 (1:128) y 2^6 (1:64). El alga *C. isthmocladum* solamente presentó actividad contra el tipo de sangre O+ con título de 2^2 (Tabla 1).

En la Tabla 2 se observan los resultados de inhibición de la hemaglutinación por azúcares (monosacáridos y derivados). Para las tres algas de la División Chlorophyta el azúcar inhibitorio fue N-acetilglucosamina, la mínima concentración inhibitoria de la aglutinación para el extracto de *C. giraffa* fue 8-mM, 125-mM se requirieron para inhibir la acción de *U. lactuca*. El extracto de *H. spinella* no fue inhibido por ninguno de los azúcares usados.

Discusión

En trabajos anteriores, la especie *U. lactuca* ha dado resultados positivos al aglutinar eritrocitos humanos (Boyd *et al.*, 1966; Blunden *et al.*, 1975; Chiles y Bird, 1989), lo cual concuerda con nuestros resultados. En la Familia Codiaceae, los representantes del género *Codium* se han destacado por presentar actividad hemaglutinante (Blunden *et al.*, 1978; Rogers *et al.*, 1980; Fabregas *et al.*, 1988b). Confirmamos en este trabajo, la actividad aglutinante de *Hypnea spinella* y *Codium giraffa* (De Lara-Isassi y Alvarez-Hernández, 1994) la última especie descrita por Silva (1979) para Bahía de Petatlán, Guerrero, considerada hasta el momento, como especie endémica para el Pacífico tropical mexicano.

En cuanto a los títulos obtenidos en los resultados los consideramos altos debido a que no se utilizaron enzimas proteolíticas para facilitar la reacción de aglutinación (Shiomi *et al.*, 1980; Rogers *et al.*, 1982; Rogers y Topliss, 1983; Hori *et al.*, 1988) además de compararlos con los títulos obtenidos en trabajos donde se utilizaron eritrocitos nativos (Boyd *et al.*, 1966; Rogers *et al.*, 1980; Fabregas *et al.*, 1985; Ainouz y Sampaio, 1991) nuestros resultado muestran un incremento en el título de aglutinación de dos veces más los obtenidos en los referidos trabajos, por lo que consideramos que existe una lectina con potente actividad presente en las algas *C. giraffa* e *H. spinella*.

La inhibición de la actividad aglutinante por azúcares como N-acetilglucosamina ha sido reportada para *C. fragile* var. *atlanticum* (Rogers *et al.*, 1986), *C. tomentosum* (Fabregas *et al.*, 1988a), reportándose proteínas con peso molecular entre 15-50 Kd. que no presentan dependencia de cationes divalentes para su actividad, esto apoya la tesis de Rogers y Hori (1993) de que las lectinas de algas verdes son proteínas, algunas de las cuales unen específicamente sacáridos como N-acetilglucosamina, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para *C. giraffa* y *C. isthmocladum*.

El que ningún azúcar utilizado en este trabajo haya inhibido la actividad aglutinante de *H. spinella* no significa que no posea una lectina, las macroalgas de la División Rhodophyta de las que se han aislado estas moléculas, solamente fueron inhibidas por glicoproteínas o carbohidratos de tipo complejo como: transferrina, fetuina, mucina submaxilar bovina, mucina estomacal porcina, mananos de levaduras y ovoalbúmina, entre otras (Hori *et al.*, 1986b, 1987 y 1988b; Rogers y Topliss, 1983; Rogers *et al.*, 1990).

Tabla 1. Resultados de las pruebas de aglutinación de varias especies de macroalgas de las costas mexicanas.

División y especies	Localidad	Estado	Tipo de sangre		
			O+	A+	B+
Chlorophyta					
<i>Chaetomorpha anteninna</i>	Cacalotepec	Oaxaca	—	—	—
	Zicatela	Oaxaca	—	—	—
<i>Codium giraffa</i>	Zicatela	Oaxaca	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷
<i>Codium isthmocladum</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	2 ²	—	—
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	Zipolite	Oaxaca	—	—	—
	Cacalotepec	Oaxaca	—	—	—
	Zicatela	Oaxaca	—	—	—
	Acapulco	Guerrero	—	—	—
<i>Halimeda discoidea</i>	Zipolite	Oaxaca	—	—	—
<i>Halimeda opuntia</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Halimeda tuna</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Udotea flabellum</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Ulva fasciata</i>	La Pesca	Tamaulipas	—	—	—
<i>Ulva lactuca</i>	Carrizalillo	Oaxaca	—	—	—
	Punta Arena	Oaxaca	2 ⁸	2 ³	2 ¹
Phaeophyta					
<i>Chnoospora minima</i>	Cacalotepec	Oaxaca	—	—	—
	Zicatela	Oaxaca	—	—	—
<i>Dictyota bartairessi</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Dictyota cervicornis</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Padina durvillaei</i>	Acapulco	Guerrero	—	—	—
	Zicatela	Oaxaca	—	—	—
<i>Padina gymnospora</i>	Acapulco	Guerrero	—	—	—
	Zicatela	Oaxaca	—	—	—
<i>Sargassum filipendula</i>	La Pesca	Tamaulipas	—	—	—
<i>Sargassum fluitans</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Sargassum hystrix</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Sargassum liebmanii</i>	Tangolunda	Oaxaca	—	—	—
	Cacalotepec	Oaxaca	—	—	—
<i>Sargassum polyceratum</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Sargassum pteropleuron</i>	La Pesca	Tamaulipas	—	—	—
<i>Styopodium zonale</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Turbinaria tricostrata</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Turbinaria turbinaria</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
Rhodophyta					
<i>Amphiroa beauvoissi</i>	Zicatela	Oaxaca	—	—	—
	Cacalotepec	Oaxaca	—	—	—
<i>Amphiroa fragilissima</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Amphiroa mexicana</i>	Zicatela	Oaxaca	—	—	—
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
	La Costa	Chiapas	—	—	—
<i>Galaxaura oblongata</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—
<i>Hypnea musciformis</i>	La Pesca	Tamaulipas	—	—	—
<i>Hypnea spinella</i>	Puerto Escondido	Oaxaca	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁶
<i>Laurencia poiteau</i>	Puerto Morelos	Quintana Roo	—	—	—

-- No se observó aglutinación.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de aglutinación y ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante.

División Chlorophyta	Localidad	Concentración mínima inhibitoria (mili-Molar)	
		N-acetilglucosamina*	D-Glucosa*
<i>Codium giraffa</i>	Punta Arena, Oaxaca	8	—
<i>Codium lithmocladium</i>	Puerto Morelos, Quintana Roo	125	—
<i>Ulva lactuca</i>	Punta de Zicatela, Oaxaca	62.5	125
División Rhodophyta			
<i>Hypnea spinella</i>	Puerto Escondido, Oaxaca	—	—

2° Título de aglutinación.

— No se observó inhibición de la aglutinación.

* Azúcares inhibitorios.

También se probaron los siguientes azúcares y derivados: D-Manosa, D-Galactosa, N-acetilmanosamina, N-acetilgalactosamina y ácido acetilneuramínico (ninguno de los anteriores inhibió la aglutinación).

Literatura citada

Ainouz, L. I. and A. H. Sampaio, 1991. Screening of Brazilian marine algae for Haemagglutinins. *Bot. Mar.*, 34: 211-214.

Blunden G. D., J. Rogers and W. F. Franham, 1975. Survey of British seaweeds for haemagglutinins. *Lloydia*, 38: 162-168.

Blunden, G. D., J. Rogers and W. F. Franham, 1978. Hemagglutinins in British marine algae and their possible Taxonomic value. In: D.E.G. Irvine and J. H. Price (Eds.), *Modern Approaches to the Taxonomy of Red and Brown Algae*. Academic Press. London, pp. 21-54.

Boyd, W. C., L. R. Almodovar and L. C. Boyd, 1966. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. *Transfusion*, 66: 82-83.

Chiles, T. C. and K. T. Bird, 1989. A comparative study of animal erythrocytes agglutinins from marine algae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B: 107-111.

Chiles, T. C. and K. T. Bird, 1990. *Gracilaria tikvahiae* agglutinin. Partial purification and preliminary characterization of its carbohydrate specificity. *Carbohydrate Research*, 207: 319-326.

De Lara-Isassi, G. y S. Alvarez-Hernández, 1994. Actividad Biológica de las Macroalgas Marinas Mexicanas. *Rev. Soc. Hist. Nat.*, 45: 51-60.

Fabregas, J., A. Muñoz, J. Llovo and J. Abalde, 1984. Agglutinins in Marine Red Algae. *ICRS Med. Sci.*, 12: 298-299.

Fabregas, J., J. Llovo and A. Muñoz, 1985. Hemagglutinins in Red Seaweeds. *Bot. Mar.*, 28: 517-520.

Fabregas, J., A. Muñoz and J. Llovo, 1986. Hemagglutinins in Brown Seaweeds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 97: 213-219.

Fabregas, J., A. Muñoz, J. Llovo and A. Carracedo, 1988a. Purification and partial characterization of tomentine. An N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds.) Stack. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 124: 21-30.

Fabregas, J., J. Llovo and A. Muñoz, 1988b. Agglutination activity of algal extracts against spermatozoa of the fish *Dilodus sargus* L. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 2121-2126.

Ferreiros, C. and M. T. Criado, 1983. Purification and partial characterization of a *Fucus vesiculosus* agglutinin. *Rev. Esp. Fisiol.*, 29: 51-60.

Hori, K., C. Oiwa, K. Miyazawa and K. Ito, 1988a. Evidence of wide distribution of agglutinins in marine algae. *Bot. Mar.*, 31: 133-138.

Hori, K., H. Matsuda, K. Miyazawa and K. Ito, 1987. A Mitogenic Agglutinin from the Red Alga *Carpopeltis flabellata*. *Phytochemistry*, 26: 1335-1338.

Hori, K., K. Miyazawa and K. Ito, 1981. Hemagglutinins in Marine algae. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47: 793-798.

Hori, K., K. Miyazawa and K. Ito, 1986a. Isolation and characterization of glycoconjugate-specific isoagglutinins from a marine green alga *Boodlea*

- coacta* (Dickie) Murray et De Toni. *Bot. Mar.*, 29: 323-328.
- Hori, K., K. Miyazawa and K. Ito, 1988b.** Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Soliera robusta*. *Phytochemistry*, 26: 2063-2067.
- Hori, K., K. Miyazawa, N. Fusetani, K. Hashimoto and K. Ito, 1986b.** Hypnins, low-molecular weight peptidic agglutinins from a marine alga, *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 873: 228-236.
- Kamiya, H., K. Ogata and K. Hori, 1982.** Isolation and Characterization of a New Agglutinin in the Red Alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. *Bot. Mar.*, 25: 537-540.
- Kamiya, H., K. Shiomi and Y. Shimizu, 1980.** Marine biopolymers with cell specificity. III. Agglutinins in the red alga *Cystoclonium purpureum*: isolation and characterization. *J. Nat. Products*, 43: 136-139.
- Lis, H. and N. Sharon, 1981.** Lectins in Higher Plants. In: Marcus, A. (Ed.). *The Biochemistry of plants: A Comprehensive Treatise*. Vol. 6. Academic Press, pp. 371-447.
- Lis, H. and N. Sharon, 1986.** Biological Properties of Lectins. In: Marcus, A. (Ed.). *The Lectins properties. Functions and applications in Biology and Medicine*. Academic Press, pp. 265-291.
- Muñoz, A., J. Llovo and J. Fábregas, 1985.** Hemagglutininas de Algas Verdes. *Acta Científica Compostelana. Universidad de Santiago de Compostela, España*, 22: 873-878.
- Muñoz, A., J. Llovo and J. Fabregas, 1987a.** Different Agglutinin Activity of Red Marine Algae against Erythrocytes from Several Animal Species. *Thalassas*, 5: 87-89.
- Muñoz, A., J. Llovo, M. Romaris y J. Fábregas, 1987b.** Utilización de Algas Marinas como un nuevo criterio de diferenciación de las libreas de *Labrus bergylta* Ascanius. *Cuad. Marisq. Publ. Tec.*, 12: 251-256.
- Muñoz, A., J. Llovo, M. Romaris y J. Fábregas, 1987c.** Presencia de Receptores para Agglutininas Algales sobre la superficie de eritrocitos de peces. *Cuad. Marisq. Publ. Tec.*, 12: 245-250.
- Rogers, D. J. and J. A. Topliss, 1983.** Purification and Characterisation of an Anti-Sialic Acid Agglutinin from the Red Alga *Soliera Chordalis* (C. Ag.) J. Ag. *Bot. Mar.*, 24: 301-305.
- Rogers, D. J. and K. Hori, 1993.** Marine algal lectins: new developments. *Hydrobiologia*, 260/261: 589-593.
- Rogers, D. J. and M. M. Galander, 1988.** Purification and characterization of a lectin from the red alga *Griffithsia flocculosa*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 38: 323-331.
- Rogers, D. J., B. C. Fish and C. J. Barwell, 1990.** Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata* In: Kocourek, J. and D. L.J. Freed (Eds.). *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA. Vol. 7, pp. 49-52.
- Rogers, D. J., G. Blunden, and P. R. Evans, 1977.** *Ptilota plumosa*, a new source of a blood-group B specific lectin. *Med. Lab Sci.*, 34: 193-200.
- Rogers, D.J., G. Blunden, J. A. Topliss and M. D. Guiry, 1980b.** A survey of some marine organisms for Haemagglutinins. *Bot. Mar.*, 23: 560-577.
- Rogers, D. J., G. Blunden, M. D. Guiry and M. T. Northcott, 1982.** Evaluation of *Ptilota plumosa* from Ireland as a source of Hemagglutinins. *Bot. Mar.*, 25: 399-400.
- Rogers, D. J., R. W. Loveless and P. Blading, 1986.** Isolation and characterisation of the lectins from subspecies of *Codium fragile*. In: T. C. BØg-Hansen and E. Van Driessche (Eds.). *Lectins. Volume V*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, pp.155-160.
- Sharon, N. and H. Lis, 1972.** Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science*, 177: 949-959.
- Shiomi, K., H. Yamanaka and T. Kikuchi, 1980.** Biochemical properties of Hemagglutinins in the red alga *Serraticardia maxima*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46: 1369-1373.
- Shiomi, K., H. Yamanaka and T. Kikuchi, 1981.** Purification and Physicochemical Properties of a Hemagglutinin (GVA-1) in the Red Alga *Gracilaria verrucosa*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47: 1077-1084.
- Shiomi, K., H. Yamanaka and Y. Shimizu, 1979.** Purification of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. *Biochim. Biophys. Acta*, 576: 118-127.
- Silva, P. C., 1979.** *Codium giraffa*, a new marine green alga from tropical Pacific México. *Phycologia*, 18: 246-268.
- Stoll, V. S., and J. S. Blanchard, 1990.** Buffers: Principles and practice. In: Deutscher, M. P. (Ed.) *Methods in Enzymology*. Vol. 182. Academic Press. San Diego, California, pp. 24-37.