

## INVESTIGACION DE FITOHEMAGLUTININAS EN ALGUNAS CRIPTOGAMAS

CELIA DUBOVOY

Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Autónoma de México

SALOMON CALDERON

Departamento de Investigaciones Inmunológicas  
Secretaría de Salubridad y Asistencia

TEOFILO HERRERA

Departamento de Botánica del Instituto de Biología  
Universidad Nacional Autónoma de México

### INTRODUCCION

Desde hace varios años se ha descrito que los extractos obtenidos de las semillas de diversas plantas, son capaces de aglutinar los glóbulos rojos humanos, así como los de otras especies. A estas substancias se les dio el nombre inicial de fitohemaglutininas,<sup>5, 61</sup> posteriormente se les llamó lectinas<sup>8</sup> (nombre dado por Boyd, que proviene del latín "legere" — escoger) para diferenciarlas de los verdaderos anticuerpos formados por estimulación antigénica.

Para ser consideradas como anticuerpos es necesario que reúnan el mayor número de características semejantes a ellos, y las fitohemaglutininas presentan varias diferencias además de no formarse por estimulación antigénica, ya que nos es imposible pensar que las plantas hayan sido expuestas a los antígenos sanguíneos con las cuales reaccionan.

### OBJETO DEL PRESENTE ESTUDIO

A) Investigación de fitohemaglutininas en diversas plantas:

1. Presencia de fitohemaglutininas en algunas criptógamas.

- a) En bacterias.
- b) En hongos.
- c) En líquenes.
- d) En esporas de algunos helechos.

2. Presencia de fitohemaglutininas en fanerógamas (angiospermas y gimnospermas).

- a) Estudio sobre su presencia en semillas.
- b) En bulbos vegetales.
- c) Mención de su incidencia en otros órganos vegetales, citando algunos casos estudiados.

B) Estudio cuantitativo de la fitohemaglutinación de distintas especies con el objeto de observar si por este fenómeno y su especificidad para ciertos grupos sanguíneos, pudiera hacerse una distinción entre especies vegetales y variedades de una misma especie.

C) Observaciones botánicas generales en las plantas que presentan fitohemaglutininas.

D) Estudio inmunológico de algunas fitohemaglutininas.

E) Breve estudio sobre el efecto de algunos factores físicos en la hemaglutinación.

### A) MATERIAL EMPLEADO EN EL PRESENTE ESTUDIO

La mayor parte de las semillas utilizadas se obtuvieron del jardín botánico de la UNAM estando debidamente identificadas las plantas por especímenes botánicos completos.

Gran parte de los hongos reportados en este estudio se obtuvieron del Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la UNAM donde fueron clasificados de acuerdo con sus formas de reproducción; éstos fueron conservados en cajas que contenían como pre-

servativo unos cristales de para-dicloro-benceno, substancia que no consideramos altere el proceso de aglutinación. Las semillas, en su mayoría, son mexicanas, pero algunas proceden de diversos países de todos los continentes.

Los hongos y los líquenes fueron colectados en los alrededores del Valle de México y en distintos estados de la República Mexicana. En su mayoría se utilizaron desecados.

Otra parte de las semillas, bulbos y hongos, fueron adquiridos en mercados de la ciudad de México y en tiendas de semillas. Estas últimas fueron clasificadas en la escuela de Agricultura de Chapingo, México.

Las bacterias, en forma de antígenos ya preparados, se obtuvieron del Hospital Infantil de la ciudad de México.

Los distintos tipos de sangre humana empleada, se obtuvieron frescos diariamente.

#### B) METODOS EMPLEADOS

La técnica siguiente fue empleada en forma general para hongos y líquenes. En primer lugar, el material fue limpiado cuidadosamente evitando la presencia de porciones de corteza de árbol, o de tierra, la cual, por su contenido en bacterias, alteraría notablemente la reacción dando en algunos casos falsas reacciones positivas.

El material, en su mayoría hongos y líquenes desecados y frescos, fue pesado con precisión tratando de pesar por lo menos 2.5 a 5 gm.

Se hizo una solución de NaCl al 8.5%.

Al material pesado (una unidad X de peso), se le agregó la solución salina (9 unidades de peso) o sea, se formó una solución al 10%.

El material así preparado, fue molido en licuadora o bien en un mortero si la cantidad era escasa; después de obtenido el extracto, fue filtrado en papel filtro común para eliminar las partículas de gran tamaño; si el extracto, después de filtrado, se veía perfectamente claro y sin grumos, así se usaba, pero en la mayor parte de los casos no bastó con filtrar el extracto, sino que fue necesaria la centrifugación a alta velocidad con la cual se obtuvieron extractos claros. En numerosas ocasiones la centrifugación fue necesaria por lar-

go tiempo, ya que los extractos vegetales, en algunos casos, son muy densos, como sucede con algunas agaricáceas.

Después de centrifugado el extracto, se desechó el precipitado y el sobrenadante opalescente se pasó a frascos reactivos y fue refrigerado durante 24 horas, ya que las fitohemaglutininas se liberan más fácilmente por refrigeración, y se observa variación en la reacción de acuerdo con el período en que con algunas agaricáceas.

Previamente se tomó el pH de cada extracto, el cual, en general, presentaba una gran tendencia a ser ácido, encontrándose en la mayor parte de los casos un pH entre 5 y 7.

Al día siguiente de preparado el extracto, éste era utilizado para la fitohemaglutinación; generalmente después de refrigerado precipitan ciertas partículas, por lo que fue necesaria la recentrifugación y eliminación del precipitado, ya que de otra manera los eritrocitos se unen a los residuos y puede presentarse una aglutinación simulada.

En general, se utilizaron extractos frescos, excepto algunos que, con fines de investigación, fueron dejados durante un año en congelación para comparar su actividad con relación a los extractos frescos.

En el caso de los hongos se estudiaron pileo, estípites y esporas, cada uno por separado con el fin de observar por medio de la aglutinación las diferencias químicas posibles de estas estructuras.

También se prepararon esporadas de algunos hongos. Como no siempre se obtienen esporadas abundantes, en numerosas ocasiones fue necesario trabajar con cantidades mínimas de esporas.

Una vez que se hizo el extracto de pileo en la forma habitual, éste fue separado en 3 porciones, una que permaneció refrigerada hasta el día siguiente, y las otras dos que fueron utilizadas para observar los cambios provocados por la temperatura en un tiempo dado. Uno de ellos fue colocado a 37° centígrados y estudiado a las 2 horas, y el otro a 50° C, durante 15 minutos para observar si en este lapso existía una desnaturalización rápida y por este comportamiento poder hacer una comparación con otras fitohemaglutininas vegetales. Los demás estudios sobre factores físicos fueron hechos con fitohemaglutinina refrigerada o bien con extractos preparados

aparte, con distintas soluciones amortiguadoras (Buffers).

Para el trabajo de esporas, ante todo, fue necesario el rompimiento de las cápsulas, el cual se hizo por los métodos siguientes: en algunos casos las esporas fueron previamente liofilizadas; a la cantidad total se le agregó solución de NaCl al 8.5% para formar una dilución al 10%; esto fue colocado en un frasco de boca ancha con bolas grandes de porcelana y con suficiente cantidad de granalla de vidrio; se sometió a la acción de un molino en el cual la rotación continua produce movimiento de las bolas de porcelana que al ponerse en contacto con la granalla, rasgan la cápsula de las esporas después de cierto tiempo. El molido fue llevado a cabo a temperatura de laboratorio, pero se trató de evitar la posible descomposición del extracto que se presenta en algunos casos, por lo que después de estar una hora en el molino, el frasco era colocado en congelación durante una hora, provocando así la congelación y descongelación que ayudan al rompimiento de las cápsulas.

El extracto era tratado en esta forma durante 3 ó 4 días, después de los cuales se hacía una microscopía; si eran pocas las esporas con cápsula rota, se continuaba moliendo; al calcular que más del 50% de las esporas tenían la cápsula destruida, el extracto era centrifugado, formándose 3 porciones: granalla de vidrio más resto de esporas, cápsulas y por último el sobrenadante, el cual frecuentemente presentaba ciertas esporas no precipitadas, siendo filtrado 2 veces consecutivas hasta quedar la solución clara que se utilizó en el estudio. En otras ocasiones las esporas no fueron molidas sino tratadas por simple congelación y descongelación rápida durante varias horas; para esto se utilizó hielo seco con alcohol de 96°; una vez congeladas las esporas, el tubo era colocado en agua ligeramente tibia para su rápida descongelación.

A todos los extractos de hongos se les agregó mertiolato en proporción de una gota por c.c. para evitar en lo más posible la contaminación bacteriana y la presencia de falsas aglutinaciones.

En el caso de los helecchos se buscó la presencia de fitohemaglutininas únicamente en las esporas, sin hacer, en ningún caso, estudio de las frondas.

El trabajo con esporas se realizó exactamente en la misma forma empleada con esporas de hongos.

Para estudiar la aglutinación se utilizaron sangres humanas obtenidas diariamente frescas, en ninguna ocasión se utilizaron sangres conservadas ya que en algunos intentos de su uso se observó, en su título, una disminución notable de la aglutinación, y en una ocasión, con el extracto de *Phaseolus vulgaris*, se presentó pérdida total de la aglutinación. En esto no están de acuerdo todos los autores; por ejemplo, O. Mäkella dice que los títulos no varían aun utilizando sangre conservada por una semana, posiblemente esta diferencia se encuentre en el anticoagulante empleado, ya que Mäkella utilizó sangre citratada y nosotros oxalata.

Las sangres, después de extraídas, fueron colocadas en frascos con anticoagulante utilizando oxalato de potasio o bien una mezcla de oxalato de amonio y potasio.

Cada una de las sangres fue tipificada por medio de sueros comerciales anti "A" y anti "B". Se trabajaron únicamente los 4 grupos sanguíneos principales sin tomar en cuenta el factor Rh, no se investigaron grupos como "M", "N", "Le" etc.

Para la tipificación de grupos sanguíneos se utilizó la prueba de aglutinación en placa, que consiste en lo siguiente: en un portaobjetos se colocaron, con pipeta Pasteur, dos gotas de una misma sangre (una gota hacia el lado derecho y otra hacia el izquierdo); a la primera gota se le agregó una gota de suero anti "A", y a la segunda anti "B" cada una de ellas fue mezclada y extendida con un aplicador sobre la superficie del portaobjetos. La lámina fue rotada por un tiempo corto de atrás hacia delante y en forma circular, y se observó la presencia de aglutinación durante un período de dos minutos después de efectuada la mezcla.

#### Interpretación de Resultados

Sangre + Anti "A" (+) y Anti "B" (-) = Grupo "A".

Sangre + Anti "A" (-) y Anti "B" (+) = Grupo "B".

Sangre + Anti "A" (-) y Anti "B" (-) = Grupo "O".

Sangre + Anti "A" (+) y Anti "B" (+) = Grupo "AB".

Una vez tipificadas las sangres, se procedió al estudio de fitohemaglutinación provocada por los extractos, utilizando sangre total.

Para la observación de dicho fenómeno se empleó una lámpara especial.

Una gota de extracto más una gota de sangre total fueron colocadas sobre el vidrio de la lámpara con pipetas Pasteur de 1.5 mm de diámetro.

En numerosas ocasiones se observó que la fitohemaglutinina se encontraba demasiado diluída en el extracto, y al colocar una gota de éste más una de sangre no existe suficiente cantidad de lectina que dé una reacción evidente, ya que en este caso, como en otros tipos de aglutinación, se requiere una cantidad óptima de aglutinina para que se presente. En tales casos en que se observaba una ligera tendencia de aglutinación con una gota de extracto, se agregaba otra o algunas más y la aglutinación era muy clara. Hecho lo anterior, se mezcló sangre y extracto con un aplicador y se extendió sobre el vidrio rotando la lámpara inmediatamente de atrás hacia delante y circularmente.

Esto se hizo durante 3 a 5 minutos y si en este lapso la mayoría de las células aparecían formando conglomerados, la aglutinación era considerada como positiva. En numerosas ocasiones el extracto no poseía fitohemaglutinina, pero precipitaba fácilmente con el suero formando grumos grandes que de ninguna manera tienen la misma apariencia que la aglutinación; sin embargo, en tres casos hubo un error inicial, como con el extracto de *Dahlia coccinea* en que un precipitado semejava aglutinación, pero al observar la ausencia de ésta con glóbulos lavados, se procedió a la observación microscópica comprobando realmente un precipitado, el cual fue corroborado aún más al colocar en tubos capilares el extracto con suero.

En su mayor parte la observación de la hemaglutinación fue hecha macroscópicamente y con ayuda de una pequeña lupa; debido a esto, si existen algunos extractos con escasa cantidad de lectina y presentan aglutinación únicamente microscópica, no los tenemos reportados en el presente estudio.

Cada extracto era probado con los 4 grupos sanguíneos principales "A", "B", "O" y "AB" por el procedimiento anteriormente citado. Frecuentemente no se contaba con sangre "AB" debido a la rareza de su presencia.

Se anotaron primeramente las reacciones del extracto pudiendo presentarse las siguientes:

A) Presencia de homogeneidad total de la suspensión, habiendo una carencia total de hemaglutinación.

B) Presencia de aglutinación igual para todos los grupos sanguíneos, o sea una total inespecificidad de reacción entre eritrocitos y extractos.

C) Especificidad parcial en la reacción, o sea que, por ejemplo, dos grupos sanguíneos pueden ser aglutinados y el resto no, o bien con una menor titulación.

D) Especificidad total, en la cual sólo uno de los grupos sanguíneos es aglutinado, y si lo son algunos de los demás, es sólo con titulaciones sumamente bajas, mientras que con el grupo específico la aglutinación es más fuerte y con una titulación mucho más elevada.

En algunos casos se presentó aglutinación tardía, o sea después de 5 minutos, que es lo que se consideró como tiempo máximo para la presencia de reacción; entonces, ante todo se procedió a utilizar mayor cantidad de extracto para ver si aumentando la cantidad de lectina la reacción se aceleraba; si esto no ocurría, la aglutinación tardía no era tomada en cuenta ya que los eritrocitos, al ir secándose la sangre, tienden a formar grumos semejando falsas aglutinaciones.

De los estudios realizados con sangre total, se demostró que la aglutinación por lectinas se semeja macro y microscópicamente a la que se presenta por isoaglutininas animales.

Los extractos con reacción negativa por sangre total inicialmente fueron desechados, aunque posteriormente se conservaron en congelación como los que presentaban reacción positiva, debido a un fenómeno interesante que será discutido posteriormente.

Los positivos siempre fueron conservados para hacer otras investigaciones posteriores. Se trató de evitar la permanencia de ellos por un largo tiempo a temperatura de laboratorio, manteniéndose refrigerados mientras no eran utilizados.

Una vez probados con sangre total se procedió a su estudio con eritrocitos lavados, separándose totalmente el plasma de la sangre.

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se preparó solución salina fisiológica de 0.85%, con la cual se lavaron los eritrocitos. Sangre de cada uno de los diferentes grupos fue colocada en tubos de ensayo y a cada uno se le agregaron 5 volúmenes de la solución salina fisiológica.

Sangre y solución salina fueron mezclados en cada tubo y centrifugados a velocidad mediana durante 5 minutos, el sobrenadante fue desechado dejando el precipitado formado por las células, a éstas se les agregó solución salina nuevamente y así fueron lavados los eritrocitos, como en la primera ocasión, durante tres veces consecutivas.

Después de lavar los eritrocitos por última vez, éstos se suspendieron en solución salina en una proporción de 2%, generalmente colocando un mililitro de paquete globular en 50 mililitros de solución salina al 0.85%.

Realizado esto, se inició un nuevo estudio de aglutinación, utilizando cada extracto frente a los diferentes aglutinógenos sanguíneos en ausencia total de plasma y suero.

La aglutinación que se presenta con eritrocitos lavados, en general no es tan clara y quizá más débil que la que se presenta con sangre total; sin embargo, éste es el método tomado como el más preciso.

Si se observaba aglutinación se procedía a hacer el análisis cuantitativo de ésta, en los grupos con los cuales el extracto reacciona.

El método cuantitativo es la llamada titulación que nos indica en este caso la cantidad relativa de lectina y su actividad de aglutinación.

En el presente trabajo se expresa el título en función de la dilución límite, en la cual consideramos que existe una cierta concentración límite, por debajo de la cual la fitohemaglutinina será inactiva o bien no producirá ningún efecto visible; se puede obtener un índice de la concentración de lectina diluyendo ésta hasta encontrar la máxima dilución que aún presenta reacción con los eritrocitos, siendo negativa la reacción para cualquier dilución superior a ésta.

En este procedimiento diluimos la lectina y mantuvimos constante la cantidad de suspensión de células.

Este método nos da valores comparativos y está sujeto a cierto error ya que haciendo diluciones sucesivas al doble, frecuentemente era difícil decidir cuál de los dos últimos

tubos daba indicios de reacción, significando esto un posible error de un 50 a un 100%, dependiendo en la estimación personal de la titulación. Se hicieron las siguientes diluciones:

1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1 600, 1:3 200, 1:6 400, 1:12 800, etc.

Para el efecto, se colocó en el primer tubo 1.8 ml de solución salina al 8.5% más 0.2 ml de extracto; en el segundo tubo se colocaron 4 mililitros de solución salina y un mililitro de la solución del primer tubo; en los tubos siguientes se colocó, en cada uno, un mililitro de solución salina más un mililitro de la solución del tubo anterior. En esto podríamos tener un cierto límite de error debido al uso de una misma pipeta para las transferencias de un tubo al otro, en vista de que se inicia con las concentraciones máximas siendo los tubos sucesivos cada vez más diluidos, tenemos el riesgo de aumentar ligeramente la concentración en cada uno de ellos.

En conclusión, la titulación aquí representada es el denominador de la dilución final de extracto que causa una aglutinación macroscópicamente perceptible.

En la titulación utilizamos los siguientes signos convencionales, debido a que con frecuencia la titulación puede ser similar para todos los grupos sanguíneos, pero con alguno de ellos el extracto puede reaccionar en forma más clara y fuerte que con otro.

++++ Aglutinación completa; muy fuerte, formando frecuentemente un gran conglomerado único de células.

+++ Aglutinación completa; clara, pero en grumos más pequeños que el anterior.

++ Aglutinación no muy completa pero aún bastante visible.

+ Conglomerados de células que son apenas perceptibles macroscópicamente.

± Indicios de aglutinación macroscópica.

En la aglutinación con sangre total se utilizaron los siguientes signos:

MF = Muy fuerte

F = Fuerte

D = Débil

MD = Muy débil

h = Hemólisis

C (X) Esto nos indica que el extracto fue negativo al colocarlo con sangre total volumen a volumen, pero se presentó reacción po-



## RESULTADOS OBTENIDOS EN HONGOS DE LA CLASE ASCOMYCETES

(Continuación)

Especie	Varios	Grupos Sang.	Sang. Total	1:1	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>Morchella esculenta f. vulgaris</i> (1)		A	+	+++++	+++++	+	±	—		
		B	+	+++++	+++++	++	+	—		
		O	+	+++++	+++++	+	±	—		
<i>Morchella esculenta f. vulgaris</i> (2)	Resultado en p $\acute{i}$ leo	A	+	+++++	++	—				
		B	+	+++++	++	—				
		O	+	+++++	++	—				
	Resultado en est $\acute{i}$ p $\acute{i}$ te	A	+	+++++	+++++	±	—			
B		+	+++++	+++++	±	—				
O		+	+++++	+++++	±	—				
<i>Helvella elastica</i>		—								
<i>Helvella crispa</i> (3)		A	+	+++++	+++++	++	+	±	—	
		B	+	+++++	+++++	++	+	±	—	
		O	+	+++++	+++++	++	+	±	—	
<i>Helvella crispa</i> (4)	Resultados en p $\acute{i}$ leo	A	+	+++++	+++++	+++	++	++	+	± —
		B	+	+++++	+++++	+++	++	++	+	± —
		O	+	+++++	+++++	+++	++	++	+	± —
	Resultados en est $\acute{i}$ p $\acute{i}$ te	A	+	+++++	+++++	±	—			
B		+	+++++	+++++	±	—				
O		+	+++++	+++++	±	—				
<i>Helvella lacunosa</i>	Resultado en p $\acute{i}$ leo	A	+	+++++	+++	+	—			
		B	+	+++++	+++	+	—			
		O	+	+++++	+++	+	—			
<i>Helvella lacunosa</i>	Resultado en est $\acute{i}$ p $\acute{i}$ te	A	+	+++++	+++	+	—			
		B	+	+++++	+++	+	—			
		O	+	+++++	+++	+	—			
<i>Helvella crispa</i> (5)	Resultado en p $\acute{i}$ leo	A	+(F)	+++++	+++++	+	—			
		B	+(MD)	+++++	+++++	±	—			
		O	+(MD)	+++++	+++++	±	—			
	Resultado en est $\acute{i}$ p $\acute{i}$ te	A	+(F)	+++++	+++	—				
B		+(MD)	+++++	+++	—					
O		+(MD)	+++++	+++	—					

(1) El resultado fue obtenido con extracto de *Morchella esculenta*, desecada.

(2) El resultado fue obtenido de la misma especie y forma, con extracto de hongo fresco.

(3) El resultado fue obtenido con extracto de *Helvella crispa* desecado.

(4) El resultado fue obtenido de la misma especie con extracto de hongo fresco.

(5) Resultados obtenidos con algunos extractos mantenidos en congelación durante un año.

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN HONGOS ASCOMYCETES

En *Morchella esculenta* es difícil interpretar por qué causa el extracto de hongo desecado presenta una mayor titulación que el fresco, ya que teóricamente se considera la presencia de una mayor cantidad de fitohemaglutinina en hongo fresco. En primer lugar, inicialmente notamos un error en nuestro método, debido a que se pesó la misma cantidad de hongo fresco y de hongo desecado, estando en este último más concentradas las sustancias, lo cual en cierta forma nos explicaría la disminución de reacción con el hongo fresco, ya que posteriormente comprobamos que una *Morchella* fresca pesa 10 veces más que la desecada, debido a su cantidad de agua y posiblemente la reacción con extracto fresco entonces no disminuya sino quede igual, ya que su concentración de fitohemaglutinina es 10 veces menor. Sin embargo, esto no nos explica totalmente la reacción presentada, ya que lo mismo podría suceder con el extracto de *Helvella crispa* fresca con relación a la desecada, y en ese caso se observó una mayor titulación en la fresca.

Se puede pensar en este caso en la posibilidad de la existencia de una variedad geográfica, y que las diferencias de contenido químico del suelo donde creció el hongo hayan provocado diferencias en la concentración de fitohemaglutinina y, en algunos casos, por esto, sea posible diferenciar variedades geográficas.

En la forma desecada la aglutinación con sangre "B" es ligeramente más fuerte, pero la titulación final es la misma.

En la forma fresca, aunque el píleo y el estípote son totalmente inespecíficos, se observa una aglutinación ligeramente más fuerte en el estípote, lo que nos muestra que el extracto de éste tiene una afinidad ligeramente mayor hacia el antígeno, pero botánicamente no se explica con claridad, ya que morfológicamente el mismo micelio constituye el píleo y el estípote.

En *Helvella crispa*, como se citó anteriormente, se observaron los resultados esperados, o sea, la fresca aglutina más fuerte y dos tubos más arriba que la desecada. En este caso incidentalmente ambas procedían de la misma localidad.

Así como anteriormente observamos que el título disminuyó con extracto de hongo desecado, es posible que hongos con baja titulación y que hayan sido conservados durante muchos años, al ser estudiados se reporten negativos.

Otro hecho observado en *Helvella crispa* es que prácticamente no hay una diferencia química entre píleo y estípote, pero sí una tendencia a mayor concentración de la fitohemaglutinina en píleo, por lo que consideramos que en este caso las ascas y estructuras reproductoras tienden a tener mayor cantidad de estas sustancias, con la posibilidad de fijar mayor cantidad de carbohidratos y permitir al hongo tener reservas de este tipo.

En *Helvella lacunosa* no hay diferencia química entre píleo y estípote ni mayor concentración de la lectina en píleo, lo cual la diferencia de las otras especies.

Con la finalidad de observar la viabilidad de algunas fitohemaglutininas de Ascomycetes se dejaron algunos extractos en congelación durante un año, lapso en el cual fueron descongelados dos veces. En general, se observó una disminución en la titulación, la cual fue muy notable en el píleo de *Helvella crispa*.

Mäkella, en sus estudios de semillas de leguminosas,<sup>72</sup> reporta que después de haber permanecido sus extractos por cuatro a seis meses en congelación, la titulación no varió siempre y cuando en este tiempo no fueran descongelados; probablemente en nuestro caso los periodos de descongelación alteraron la fitohemaglutinina.

Todos los Ascomycetes mostraron ser totalmente inespecíficos. Consideramos que la proteína activa en estos casos, así como en otros de inespecificidad, parece ser una sola especie molecular en la que cada molécula posee más de una especificidad, o si son más especies moleculares cada una posee todas las especificidades que muestra el conjunto del extracto.

Observamos que los Ascomycetes con lectinas presentan reacción positiva tanto con sangre total como con eritrocitos lavados. Aunque las reacciones con sangre total eran claras, hicimos un estudio para observar si existe algún grado de inhibición de la aglutinación provocado por el suero. Como en general, al presentarse la inhibición, parece haber un precipitado inespecífico de proteínas, hicimos los siguientes experimentos:

El extracto de *Helvella crispa* fue centrifugado a  $10\,000 \times G$  durante 10 minutos hasta que quedó lo más claro posible; en un capilar se colocó suero humano más extracto, en un segundo capilar suero bovino más extracto, y en un tercero albúmina de huevo más extracto (todos volumen a volumen). Los capilares se colocaron en plastilina y permanecieron a temperatura de laboratorio durante 48 horas, después de las cuales no se observó precipitado detectable ni macro ni microscópicamente. Por otro lado, en un tubo se colocaron 0.9 ml de suero más 0.1 ml de extracto (1:10) dejándolo durante 24 horas en el refrigerador, después de las cuales se observó un precipitado muy fino detectable únicamente al microscopio, el extracto fue recentrifugado por mucho tiempo a  $10\,000 \times G$

hasta lograr la precipitación de las partículas finas que presentaba; el precipitado fue desechado y el sobrenadante utilizado en la forma habitual, para observar los cambios de titulación de este extracto que había sido tratado con suero. Al titular observamos una ligera disminución de la aglutinación, lo que corroboraba la presencia de un precipitado inespecífico de proteínas, considerándose por lo tanto, que la misma porción molecular que actúa en la aglutinación intervino en la precipitación, y una vez precipitadas las proteínas, éstas se encuentran combinadas con una gran parte de la lectina, lo que hace que la titulación disminuya.

Los resultados de la titulación con extracto de pileo de *Helvella crispa* tratada con suero, fueron los siguientes:

<i>Helvella crispa</i> +		1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
suero, después de 24 horas de refrigeración	A	+++	++	+	±	±	—
	B	+++	++	+	±	±	—
	O	+++	++	+	±	±	—

Aparte de disminuir la titulación a la mitad hay una clara diferencia en la fuerza de aglutinación.

El extracto de *Morchella esculenta* colocado en capilares con suero humano y con suero bovino, no presentó precipitado alguno.

#### RESULTADOS OBTENIDOS EN HONGOS DE LA CLASE BASIDIOMYCETES SUBCLASE HETEROBASIDIOMYCETIDAE

Especie	Varios	Grupos Sang.	Sang. Total	1:1	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>Tremella lutescens</i>		—								
<i>Phlogiotis helvelloides</i>		—								
<i>Auricularia polytricha</i>		—								
<i>Auricularia auricula</i>		—								
<i>Auricularia fuscossuccinea</i>		—								
<i>Ustilago maydis</i>		—								



RESULTADOS OBTENIDOS EN HONGOS DE LA CLASE BASIDIOMYCETES  
 (SUBCLASE HOMOBASIDIOMYCETIDAE)

(Continuación)

Especie	Varios	Sang. Grupos	Sang. Total	1:1	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>Stereum ostrea</i>		—								
<i>Agaricus bisporus</i>	Pileo y estípites separados	A	—	++++	+++	—				
		B	—	++++	+++	—				
		O	—	++++	++	—				
<i>Agaricus bisporus</i>	Esporas	A	—	++++	++++	+	—			
		B	—	++++	++++	+	—			
		O	—	++++	+++	±	—			
<i>Agaricus placomyces</i>	Pileo y estípites separados de Hongo fresco	A	+	++++	++++	++	±			
		B	+	++++	++++	++	±	—		
		O	+(MD)	++++	+++	++	—			
	Esporas	A	+	++++	++++	+++	+	±	—	
		B	+	++++	++++	+++	+	±	—	
		O	+(MD)	++++	++++	++	±	—		
<i>Amanita caesarea</i>	Resultados en pileo, hongo fresco	A	+(MF)	++++	+++	±	—			
		B	+(MF)	++++	+	—	—			
		O	+(MF)	++++	+++	—	—			
<i>Amanita caesarea</i>	Resultado en estípites	A	+(F)	++++	—					
		B	—	—						
		O	+(MD)	±	—					
<i>Amanita caesarea</i>	Esporas	A	+(F)	++++	++++	+	±	—		
		B	+(F)	++++	+++	±	—			
		O	+(F)	++++	+++	±	—			
<i>Amanita muscaria</i>	Resultado en pileo y esporas	A <sub>2</sub>	+	+++	++	+	—			
		B	+(MD)	+++	±	—				
		O	+	+++	++	+	—			
	Resultado en estípites	A	+	+++	++	±	—			
		B	+	+++	±	—				
		O	+	++	—					
<i>Amanita pantherina</i>		—								
<i>Amanita vaginata</i>		A	+(F)	++++	++++	+++	++	+	—	
		B	+(F)	++++	++++	++	++	++	+	—
		O	+(MD)	++	++	+	—			
<i>Cantharellus floccosum</i>		A	—	++	—					
		B	—	++	—					
		O	—	++	—					



RESULTADOS OBTENIDOS EN HONGOS DE LA CLASE BASIDIOMYCETES  
 (SUBCLASE HOMOBASIDIOMYCETIDAE)

(Continuación)

Especie	Varios	Grupos Sang.	Sang. Total	1:1	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>Lactarius deliciosus</i> var. <i>salmonicolor</i>	Hongo fresco	A	—	++++	—					
		B	—	++++	—					
		O	—	++++	—					
<i>Lactarius indigo</i>	Hongo fresco estudio en pileo y estípite separados	A	—	+++	—					
		B	—	+++	—					
		O	—	+++	—					
<i>Lepiota procera</i>	Hongo fresco estudio en pileo y estípite separados	—								
<i>Naematoloma fascicularis</i>		—								
<i>Psilocybe cubensis</i>	Estudio en pileo	A	—	++++	±	—				
		B	—	++++	±	—				
		O	—	+++	—					
<i>Psilocybe cubensis</i>	Estudio en estípite	A	+(F)	—						
		B	+(F)	—						
		O	+(F)	—						
<i>Psilocybe caerulescens</i>	Estudio en pileo y estípite separados	A	—	++++	±	—				
		B	—	++++	±	—				
		O	—	+++	—					
<i>Psilocybe mexicana</i>	Estudio en pileo y estípite separados	A	+	+++	++	±	—			
		B	+	++++	+++	±	—			
		O	+	++++	+++	±	—			
<i>Psilocybe muliercula</i>	Estudio en pileo	A	+(MF)	++++	++++	++++	++++	++	±	—
		B	+(D)	++++	++++	++++	++++	++	±	—
		O	+(D)	++++	++++	++++	++++	++	±	—
<i>Psilocybe muliercula</i>	Estudio en estípite	A	+(D)	++++	++++	++	±	—		
		B	+(MD)	++++	++++	++	+	—		
		O	+(MD)	++++	++++	++	+	—		
<i>Pholiota squarrosa</i>	Hongo fresco estudio en pileo	A	—C(3)	+++	++	±	—			
		B	—C(3)	+++	—					
		O	—C(3)	+++	++	—				
	Estudio en estípite	A	—	++++	++	++	—			
		B	—	++++	—					
		O	—	++++	+	—				

RESULTADOS OBTENIDOS EN HONGOS DE LA CLASE BASIDIOMYCETES  
(SUBCLASE HOMOBASIDIOMYCETIDAE)

(Continuación)

Especie	Varios	Grupos Sang.	Sang. Total	1:1	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>Russula sanguinea</i>		A	-h	-						
		B	-h	-						
		O	-h	-						
<i>Russula delicata</i>	Hongo fresco	A	-h	-						
		B	-h	-						
		O	-h	-						
<i>Schizophyllum commune</i>		A	-C(2)	++++	++++	+	±	-		
		B	-C(2)	++++	++++	+	±	-		
		O	-C(2)	++++	++++	+	±	-		

## SUBCLASE HOMOBASIDIOMYCETIDAE (SERIE: GASTEROMYCETES)

Especie	Varios	Grupos Sang.	Sang. Total	1:1	1:10
1) <i>Lycoperdon pyriforme</i>	Estudio en peridio	-			
	Estudio en esporas	A	-	++	-
		B	-	+	-
O		-	++	-	
2) <i>Lycoperdon pyriforme</i>	Estudio en peridio	-			
	Estudio en esporas	A	-	++++	-
		B	-	++++	-
O		-	++++	-	
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	-			
<i>Lycoperdon stellare</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	-			
<i>Lycoperdon umbrinum</i> var. <i>umbrinum</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	-			
<i>Lycoperdon umbrinum</i> var. <i>floccosum</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	-			
<i>Geastrum floriforme</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	-			

## SUBCLASE HOMOBASIDIOMYCETIDAE (SERIE: GASTEROMYCETES)

(Continuación)

Especie	Varios	Grupos Sang.	Sang. Total	1:1	1:10
<i>Geastrum triplex</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	—			
<i>Geastrum velutinum</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	A <sub>2</sub>	—	++++	—
		B	—	—	
		O	—	++++	—
1) <i>Geastrum saccatum</i>	Estudio en peridio y esporas, separados	A	—C(4)	++	—
		B	—C(4)	++	—
		O	—C(4)	++++	—
2) <i>Geastrum saccatum</i>	Estudio en peridio y esporas, separado	A	—	+	—
		B	—	+	—
		O	—	++	—
<i>Scleroderma lycoperdoides</i>		—			

## RESULTADOS OBTENIDOS CON ALGUNOS EXTRACTOS DE BASIDIOMYCETES MANTENIDOS EN CONGELACION UN AÑO

Especie	Varios	Grupos Sang.	Sang. Total	1:1	1:10
<i>Sparassis laminosa</i>		A	—	+	—
		B	—	+	—
		O	—	+	—
<i>Laccaria laccata</i>	Resultado en pileo	A	—	++	—
		B	—	+++	—
		O	—	+	—
<i>Laccaria laccata</i>	Resultado en estípite	A	—	+	—
		B	—	+	—
		O	—	+	—
<i>Psilocybe cubensis</i>	Resultado en pileo	A	—	+++	—
		B	—	+++	—
		O	—	++	—
	Resultado en estípite	A	+(MD)	—	
		B	+(MD)	—	
		O	+(MD)	—	

## DISCUSION SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN BASIDIOMYCETES

En primer lugar es necesario hacer notar que los hongos fueron conservados en algunos casos durante un período de 9 ó 10 años, lo cual sí altera la reacción, como se observó comparando titulaciones de extractos de hongos desecados con extractos de hongos frescos del mismo género, especie y variedad.

En el presente estudio se puso en evidencia claramente la labilidad de las lectinas presentes en Basidiomycetes, en los cuales en numerosos casos la aglutinación pasa rápidamente a una hemólisis. En concentraciones elevadas de extractos fuertemente aglutinantes, la hemólisis se presentó casi constantemente. Se requiere que la placa de aglutinaciones sea lavada con particular cuidado, para evitar que los extractos reaccionen hemolizando fuertemente. Diversos extractos no presentaron aglutininas pero sí hemolisinas.

Ford<sup>35</sup> absorbió la hemolisina de *Amanita muscaria* a 0°C. La hemólisis no se presentó en frío, pero fácilmente fue encontrada tan pronto como las células se separaron del extracto y fueron transferidas a un medio caliente, después de eso el extracto absorbido no hemolizaba más, aun en presencia de calor. La hemólisis, por tanto, no era debida a factores físicos como el pH.

En general observamos en nuestro estudio que el fenómeno de aglutinación puede ser recomendado, en varios casos, para la diferenciación de ciertas especies de hongos que difícilmente se distinguen unas de otras.

En Heterobasidiomycetes, todos los estudiados, casualmente carecen de fitohemaglutininas; consideramos que las especies estudiadas en este trabajo son demasiado pocas para dar una conclusión final, pero comparando con datos de otros autores, como Krüpe,<sup>63</sup> se observa que en su mayoría los heterobasidiomycetes carecen de lectinas en contraste con los homobasidiomycetes; esto nos da una diferencia química marcada en las 2 subclases.

Los homobasidiomycetes cuentan con numerosas especies aglutinantes; un 48.9% de las especies estudiadas presenta fitohemaglutininas.

Un fenómeno que se observó muy frecuentemente en este grupo fue la ausencia de aglutinación con sangre total, presentándose ésta únicamente con eritrocitos lavados. Esto no

se encontró en ningún caso en las otras criptógamas y fanerógamas estudiadas, aunque sí se encontró en varios casos en semillas cierta inhibición parcial, debida al suero.

En todos los trabajos consultados sobre hongos, esta inhibición no se reporta, ya que la mayoría de los autores trabajaron directamente con eritrocitos lavados; sin embargo, el fenómeno de inhibición parcial presentado por el suero ya había sido observado por Kräus.<sup>52</sup> Se observó que en los casos en que no se presentaba aglutinación con sangre total, cuando colocamos suero humano más extracto volumen a volumen en un capilar, se presentaba un precipitado en ocasiones muy claro y en otras sólo detectable microscópicamente. De esto concluimos que las fitohemaglutininas de homobasidiomycetes tienden a precipitar inespecíficamente las proteínas del suero y consideramos que la misma porción molecular que actúa en la aglutinación interviene en la precipitación; por lo tanto, si la fitohemaglutinina interviene en la precipitación ésta se encuentra combinada con las proteínas y la aglutinación aparece inhibida. En algunos casos, al aumentar la concentración de extracto se presenta aglutinación ya que la cantidad de lectina es mayor y puede combinarse con el antígeno sanguíneo. En otros casos, aun en concentraciones fuertes de extracto, no se presenta aglutinación alguna; es posible que la fitohemaglutinina reaccione con un grupo químico común para antígeno sanguíneo y suero, y habiendo en este caso un exceso de antígeno, se origine un bloqueo de la reacción. Sin embargo, esto no se ha podido demostrar.

Posteriormente se hicieron estudios de inhibición en hongos y logramos demostrar que, de las proteínas séricas, la gamma globulina es muy importante en la inhibición de la fitohemaglutinación.

La inhibición total de reacción, en general, se observó con extractos que presentaban una baja titulación final, lo que nos indica la baja potencia de la hemaglutinina y la mayor facilidad de bloqueo de grupos reaccionantes de ésta. En los extractos con alta titulación se mostró que reaccionaban tanto con sangre total como con eritrocitos lavados, aunque también se observó un cierto grado de inhibición. En estos casos se colocaron 1.8 ml de suero y 0.2 de extracto (1:10), se dejaron las diluciones en el refrigerador durante 24 horas,

después se centrifugaron, el precipitado fue desechado y el sobrenadante utilizado frente a eritrocitos lavados siguiendo la titulación como en el método general. El título del extracto tratado con suero era comparado con el título inicial de extracto con eritrocitos lavados y, generalmente, en el primero la titulación era bastante menor que la inicial. Esto muestra claramente que la misma molécula que aglutina, precipita el suero.

En otros casos, aunque no frecuentes en hongos, el suero actúa estimulando la aglutinación como se demostró con el extracto de *Psilocybe cubensis* (estípite), el cual únicamente reaccionó con sangre total y en presencia de albúmina bovina.

Entre los homobasidiomycetes observamos muy pocos específicos y, en general, éstos con titulaciones muy bajas, se encontraron anti "A" y anti "H", no se encontró ningún anti "B"; varios extractos presentan cierta especificidad anti "A + B", indicando que el extracto aglutina eritrocitos que contienen el aglutinógeno "A" o "B" pero no aglutina células en las que ambos faltan, o bien, se presenta una titulación menor.

Frecuentemente especímenes de una misma especie colectados en tiempos y localidades diferentes, variaron en su reacción con los eritrocitos aglutinando o no, o produciendo hemólisis. Posiblemente algunos de los hongos estudiados pertenezcan en este caso a variedades cercanamente relacionadas o a variedades geográficas de un mismo hongo. También es de considerarse que el modo de reacción sea una propiedad individual en hongos.

Se encontró que la toxicidad atribuida a algunos de los hongos de este grupo, no tiene ninguna correlación con la forma de reacción.

Se hicieron estudios sobre la localización de las lectinas en pileo, estípite y esporas, los resultados de los cuales no nos llevan a una conclusión muy generalizada, ya que en algunos casos no se presentan diferencias esenciales entre extractos de las diversas partes, aunque en general tiende a haber una mayor concentración de lectina en las estructuras reproductoras y, particularmente, en las esporas; en otros casos hay diferencias sumamente claras entre las reacciones de pileo, estípite y esporas, las cuales nos revelan diferencias químicas entre pileo y estípite, susceptibles de ser explicadas morfológicamente, aunque aparen-

temente el mismo micelio constituya ambas partes.

En *Agaricus bisporus* se observa que todas las estructuras del hongo tienden a presentar reacción ligeramente más débil para sangre "O"; sin embargo, la titulación final es la misma. La concentración de fitohemaglutinina es mayor en las esporas.

*Agaricus placomyces* tiene una titulación final más elevada que el anterior, reaccionando también más débilmente con sangre "O" y presentando con ésta una titulación menor. La centrifugación de lectina en esporas no es notablemente mayor.

En *Amanita caesarea* no se observó ningún cambio en titulación al trabajar con hongos frescos o desecados. Este extracto mostró diferencias químicas en pileo y estípite. El pileo presenta reacción muy fuerte con sangre total y con eritrocitos lavados de todos los grupos; aparentemente no muestra ninguna especificidad, pero haciendo diluciones más cuidadosas, no pasando de 1:10 a 1:50, se observa que mientras que con sangre "B" y "O" reacciona hasta 1:30, con sangre "A" llega hasta 1:50, mostrando una mayor afinidad por este grupo.

En el estípite las reacciones con sangre total y con eritrocitos lavados son muy débiles sobre todo con sangre "O". Lo más interesante es que presenta ausencia de fitohemaglutinina para grupo "B" que nos revela una diferencia en el contenido químico con relación al pileo; esta diferencia debe ser en el contenido de proteínas reaccionantes las cuales, como citaremos posteriormente, en este caso parecen no ser gamma globulinas. Con sangre "A" total la reacción es bastante fuerte, aunque con eritrocitos lavados "A" la titulación es muy baja.

En realidad es difícil interpretar estos datos tomando en cuenta que las esporas (que podrían tener constitución química diferente), no atraviesan el papel filtro común, y si lo hiciesen, son eliminadas por centrifugación, lo que no nos permite comprender la existencia de diferentes grupos químicos en el pileo, principalmente de aquellos que permiten la unión con sangre "B", así como el mayor poder de reacción presente. Esto nos indica la posibilidad de variaciones químicas en el himenio; sin embargo, se observa en pileo y estípite una tendencia a presentar la mayor reacción con sangre "A" aunque con

titulación menor en el estípite. El extracto de este último puede ser considerado como un específico anti "A" muy débil.

Es necesario hacer notar que en el presente trabajo los resultados presentados con *Amanita caesarea* son completamente distintos de los reportados por A. W. Berenheimer,<sup>4</sup> quien reporta la misma especie negativa para todos los grupos sanguíneos; no ha sido trabajada por ningún otro autor, por lo que carecemos de mayor comparación.

Sin embargo, los presentes resultados fueron verificados durante 6 veces consecutivas, pero debido a que la técnica de Berenheimer varía en varios aspectos con la aquí utilizada, principalmente en la diferente concentración de solución salina y temperatura, se optó por seguir la técnica de este autor, con la finalidad de observar si la variación es debida al hongo, que posiblemente sea otra variedad de la misma especie, o bien si las diferencias se basan en el método.

Seguimos la siguiente técnica:

#### METODO DE ALAN W. BERENHEIMER

Utilizamos *Amanita caesarea* fresca, pesamos 10 g de píleo fresco y colocamos en una ultralicuadora junto con 4 veces este peso de solución fría de NaCl 0.9%. Licuamos durante 3 minutos y posteriormente centrifugamos por 10 minutos a aproximadamente  $10\,000 \times G$ ; como el sobrenadante no quedó claro, fue recentrifugado. El precipitado insoluble fue desechado y los sobrenadantes fueron colocados a  $-20^{\circ}C$  por 2 días. La congelación de los extractos hizo que nuevamente se formara un precipitado insoluble, por lo que volvimos a centrifugar a  $10\,000 \times G$ . Las pruebas de hemaglutinación fueron llevadas a cabo en tubos en los cuales se colocaron 0.01 ml de la dilución de extracto y 0.04 ml de una suspensión al 3% de eritrocitos lavados. Las diluciones del extracto fueron las mismas que habitualmente, pero preparadas con solución de NaCl 0.9%.

Los tubos fueron leídos después de mezclar las soluciones y dejarlas durante 60 minutos a temperatura del laboratorio. La titulación es la máxima dilución del extracto que produce aglutinación macroscópicamente detectable en 60 minutos.

Antes de trabajar con glóbulos lavados se trabajó el extracto preparado con este mé-

do, con sangre total, presentándose una aglutinación positiva muy fuerte con sangre "A", "B" y "O" igual a la existente anteriormente con nuestra técnica. Posteriormente trabajamos con eritrocitos lavados y observamos aglutinación muy clara, aunque el método utilizado es muy diferente del que habitualmente usamos, se obtuvo la siguiente titulación:

Sangre "A"	1:1	++++	1:10	+++	1:50	±
Sangre "B"	1:1	++++	1:10	+++	1:50	—
Sangre "O"	1:1	++++	1:10	+++	1:50	—

**CONCLUSIÓN.** La titulación final y la fuerza de la aglutinación es la misma que anteriormente, excepto algo más fuerte que antes con sangre "B" en la dilución 1:10. Los resultados nos comprueban claramente que la diferencia en reacción no es debida al método empleado, ya que aunque presenta numerosas variantes, los resultados fueron iguales a los anteriores; las diferencias, por lo tanto, son completamente individuales, pudiendo ser esta *Amanita caesarea* de una variedad cercana a la estudiada por Berenheimer, o bien las diferencias en constitución química del suelo donde creció el hongo originaron cambios químicos en el cuerpo fructífero (caso similar se ha observado en semillas, como las de *Vicia cracca*, en las que depende del terreno de desarrollo de la planta la presencia o ausencia de las fitohemaglutininas).

En *Amanita muscaria* las reacciones son bastante diferentes de las presentes en la anterior. El extracto de píleo, en contraste con la anterior, presenta reacción débil con sangre total, sin embargo, con eritrocitos lavados la reacción es más fuerte y con mayor titulación; el extracto de píleo presenta una mayor titulación y reacción más fuerte en todas las diluciones con sangre A<sub>2</sub> y O que con sangre B. Tiene una cierta especificidad anti "H".

El extracto de estípite presenta reacciones muy diferentes; con sangre total es positivo para los 3 grupos con una aglutinación más fuerte con sangre A. Con eritrocitos lavados, presenta titulación más elevada para sangre A y B, y muy débil con O. Tiene una cierta especificidad A + B con una afinidad bastante mayor para sangre A.

*Amanita vaginata* presenta una cierta especificidad anti "A + B" ya que, aunque tam-

bién reacciona con sangre O, para ésta, la titulación es menor en dos o tres diluciones además de ser más débil la reacción. Presenta el extracto mayor afinidad por el antígeno "B", con el que se presenta la mayor titulación; sin embargo, no debe considerarse como un anti "B" ya que la reacción con sangre "A" da titulaciones muy elevadas, y si se absorbiera el extracto con sangre "A" y "O" disminuiría casi totalmente el anti "B" al mismo tiempo, debido a la homogeneidad que se presenta en las lectinas, en las cuales la absorción con un tipo de células en las que aglutinan dos o tres tipos diferentes de células, casi siempre elimina en la misma proporción los dos o tres tipos de aglutininas.

*Cantharellus floccosum* y *C. cibarius*, perteneciendo a un mismo género, difieren en la presencia de aglutinación únicamente con eritrocitos lavados en el primero y la ausencia total de reacción en el último.

*Inocybe fastigiata* e *I. lilacina* son un ejemplo claro de cómo se puede emplear el fenómeno de aglutinación para diferenciar especies; así, en el caso de *I. fastigiata*, observamos una aglutinación totalmente inespecífica pero presentando la titulación más elevada encontrada para algún hongo, además de presentar también aglutinación con sangre total; en cambio, en el caso de *Inocybe lilacina* no se presentó aglutinación con sangre total, aun a concentraciones muy elevadas de extracto y con eritrocitos lavados las titulaciones fueron las mínimas existentes; esto es de interés, ya que para numerosos autores *Inocybe lilacina* es considerado como una variedad de *I. fastigiata*.

*Clavaria pistillaris* y *Clavaria truncata*, morfológicamente muy semejantes entre sí, difieren en la ausencia de aglutinación en la primera mientras que la segunda presenta aglutinación con eritrocitos lavados.

*Laccaria laccata* presenta diferencias muy notables en las reacciones de pileo y estípite. El pileo reacciona con sangre total y posee una afinidad ligeramente mayor hacia los antígenos A + B. En el extracto de estípite no se observa reacción con sangre total y la aglutinación con eritrocitos lavados es inespecífica y muy débil; posiblemente la disminución de concentración de lectina en el estípite origine el bloqueamiento en las reacciones con sangre total, o bien el contenido químico va-

ría teniendo una mayor afinidad para ciertas proteínas del suero, con las cuales reacciona.

*Lactarius deliciosus* var. *salmonicolor* y *Lactarius indigo* no reaccionan con sangre total y aglutinan poco los eritrocitos lavados, *Russula sanguinea* y *R. delica*, que taxonómicamente son especies muy cercanas a las del género *Lactarius*, difieren de éste en que la aglutinación no se presenta ni con sangre total, ni con eritrocitos lavados.

*Pholiota squarrosa* presenta una mayor afinidad para sangre "A", tanto con extracto de pileo como de estípite, siendo casualmente la reacción algo más fuerte con extracto de estípite.

En *Psilocybe cubensis* el pileo y el estípite dan reacciones diferentes y opuestas. El pileo no reacciona con sangre total, pero aglutina eritrocitos lavados inespecíficamente con afinidad algo mayor hacia los aglutinógenos A + B. El estípite sólo aglutina en presencia de sangre total y no da reacción con eritrocitos lavados; inicialmente pensamos que la reacción con sangre total sería una falsa aglutinación o un precipitado, sin embargo, posteriormente logramos demostrar que el extracto de estípite de este hongo, posee fitohemaglutininas incompletas (univalentes), ya que al suspender eritrocitos lavados en 20% de albúmina bovina se presentó una aglutinación clara; esto nos indica que en este caso posiblemente el suero favorezca la aglutinación.

*Psilocybe caerulescens* y *P. mexicana* pueden ser fácilmente distinguidos del anterior, dado que las reacciones de pileo y estípite en este caso son iguales, los dos son totalmente inespecíficos, presentando mayor titulación el extracto de *Psilocybe mexicana*.

En *Psilocybe muliercula* las reacciones con extracto de pileo y estípite son inespecíficas, pero con mayor titulación que con las especies anteriores; la fitohemaglutinina tiende a concentrarse más en el pileo dando el extracto de éste una reacción mayor en 2 diluciones con relación a la del estípite.

Con la finalidad de observar si el cambio de lugar de recolección de una misma especie de hongo origina variación en la fitohemaglutinación, se hizo el estudio de *Lycoperdon pyriforme*, con dos especímenes, uno de los cuales fue colectado en el Desierto de Los Leones, D. F., y el otro en Salazar, Méx.; en este caso no se presentó una gran dife-

rencia, ya que la aglutinación se presentó únicamente para eritrocitos lavados, teniendo ambos extractos la misma titulación final, aunque en el segundo la aglutinación es más fuerte. También en los dos casos se observó que las esporas son las únicas que presentan lectina.

En *Gastrum velutinum* el extracto únicamente reacciona con "O" y A<sub>2</sub> por lo que tiene una especificidad anti "H" aunque extremadamente débil.

Aunque *Gastrum saccatum* morfológicamente es difícil de diferenciar de *Gastrum velutinum*, la aglutinación en éste es inespecífica, a diferencia de la anterior. En este último también se hizo estudio de dos especímenes colectados en distintos lugares; uno en Salazar, Méx., y el otro en La Sierra de Guadalupe, D. F.; hubo ligeras diferencias en la aglutinación, el primero presentó reacción con sangre total a concentraciones elevadas de extracto, mientras que en el segundo no se presentó aglutinación con sangre total; además, la aglutinación fue más fuerte con el colectado en Salazar.

Del estudio anterior concluimos que las lectinas de los hongos son en su mayor parte inespecíficas, solamente se encontraron tres casos de especificidad total: 1º Estípite de *Amanita caesarea* específico anti "A". 2º Píleo de *Amanita muscaria* específico anti "H". 3º *Gastrum velutinum* específico anti "H".

De nuestros experimentos, dejando los extractos en congelación durante un año, concluimos que el poder fitohemaglutinante de los extractos tiende a disminuir con el tiempo en todos los casos. Es interesante el hecho de que el extracto fresco de píleo de *Laccaria laccata* sí presenta aglutinación con sangre total, mientras que el conservado en congelación durante un año carece de aglutinación para sangre total, a la vez que presenta una disminución de cerca de 10 veces la titulación inicial. Esto nos indica que el suero en el extracto fresco actúa inhibiendo ligeramente la reacción, lo cual no se hace visible debido a que la lectina conserva suficiente poder aglutinante, pero, al disminuir éste, el suero bloquea totalmente la reacción.

La presencia de fitohemaglutininas, en hongos, al parecer, se encuentra gobernada por ciertas reglas botánicas y, en numerosos casos, está de acuerdo con la taxonomía vegetal en

cierto grado, pero de ninguna manera absoluto.

#### EXPERIMENTOS DE ABSORCIÓN

Por otro lado, con el fin de observar el comportamiento de la lectina en algunos basidiomycetes se hicieron estudios de absorción. La absorción en este caso consiste en tratar a la lectina con un determinado antígeno sanguíneo pretendiéndose suprimir toda su actividad con éste, y tratándola de hacer más específica con el antígeno o antígenos restantes. El estudio se hizo sobre todo con extractos aparentemente inespecíficos, pero que presentaban titulaciones distintas para cada uno de los grupos.

En un tubo se colocaron 2 cc de extracto de *Laccaria laccata* al que se le agregó un volumen de eritrocitos lavados de sangre O; la mezcla de lectina y antígeno fue colocada en el refrigerador durante 24 horas y posteriormente centrifugado; después se utilizó el sobrenadante observándose que el fluido resultante no aglutinaba a la sangre O; si aún presentaba cierta aglutinación con este grupo, se trataba al fluido con 1/4 de la cantidad de antígeno que se había utilizado inicialmente, con lo que se suprimió la reacción con sangre O. Se observó que al perderse la aglutinación con sangre O la reacción con sangre A y B disminuía en la misma proporción en que se había perdido con O y al hacer la titulación, ésta estaba notablemente disminuida con sangre A y B. Así, después de suprimir la aglutinación con sangre O las titulaciones para sangre A y B con extracto de píleo de *Laccaria laccata* fueron:

Sangre A	1:1	++++	1:10	—
Sangre B	1:1	+++	1:10	—

Si, por otro lado, el extracto de *Laccaria laccata* se absorbe con sangre A o B, en lugar de O, se observa una pérdida total de la aglutinación al ser titulado con todos los tipos de células en la manera usual; entonces concluimos que la absorción con eritrocitos "O" únicamente disminuye algo la reacción, mientras que con A y B ésta se pierde, lo que nos indica que la capacidad de absorción es más elevada para A y B lo mismo que la titulación con extracto no absorbido, es más elevada para estos grupos. Una posible explicación a esto puede ser la similitud estruc-

tural de los aglutinógenos A y B que difieren de la estructura del aglutinógeno "O". Las similitudes de los grupos A y B han interesado a varios autores considerándolas como un aglutinógeno común llamado "C".<sup>11</sup>

El hecho de que al absorber un extracto con un antígeno X se haga disminuir la titulación con los demás antígenos, diferencia las lectinas de las isoaglutininas, en las cuales, al ser absorbidas con el antígeno heterólogo, se pierde la aglutinación con éste, pero el poder de reacción con los antígenos homólogos se mantiene constante. Así, si cualquier isoaglutinina aglutina más de un tipo de células, la absorción con una de ellas suprimirá los anticuerpos que reaccionan con ella, dejando sin alterarse los anticuerpos que reaccionan con otro tipo de células. El no presentarse el mismo fenómeno en las lectinas nos indica una mayor homogeneidad de éstas.

El extracto de *Gastrum saccatum* fue absorbido con sangre "A", perdiéndose la aglutinación con todos los grupos sanguíneos.

*Psilocybe cubensis* fue absorbido con sangre O quedando una aglutinación muy ligera con sangre A y B:

A	1:1	++	1:10	—
B	1:1	++	1:10	—

Al absorber extracto de *Psilocybe cubensis* con sangre A o B se perdió totalmente la reacción, al igual que con el extracto de píleo de *Laccaria laccata*.

Con la finalidad de asegurarnos más que el suero es el que actúa como inhibidor de la reacción en los extractos que no presentan aglutinación con sangre total, hicimos los siguientes experimentos: 1º Diluciones del suero con el fin de observar con cuál se inicia la aglutinación. 2º Cuantificación proteica de suero normal y suero tratado con algún extracto.

#### DILUCIONES DE SUERO

Una vez observado el bloqueamiento provocado por el suero se procedió a hacer diversas diluciones de éste, para ver con cuál se iniciaba la aglutinación.

Se trabajó con 3 extractos que no presentaban aglutinación con sangre total: 1. *Agaricus bisporus*. 2. *Lactarius deliciosus* var. *salmonicolor* (extracto de píleo). 3. *Lactarius*

*deliciosus* var. *salmonicolor* (extracto de estípite).

Por un lado, se tomó suero y se fueron haciendo diluciones de 1:10, 1:50, 1:100, etc., en NaCl 0.85%; por otro lado, se utilizaron eritrocitos lavados, como habitualmente, de la misma sangre de la que se había obtenido el suero. Se colocó una gota de extracto más una gota de la dilución correspondiente del suero, más una gota de eritrocitos lavados.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	DILUCIONES DE SUERO				
	1:1	1:10	1:50	1:100	1:200
<i>Agaricus bisporus</i>	—	—	—	—	++
<i>Lactarius deliciosus</i> (píleo)	—	±	+++		
<i>Lactarius deliciosus</i> (estípite)	—	—	±	+++	

De los 3, *Agaricus bisporus* es el extracto que más se bloquea con el suero y únicamente comienza a aglutinar hasta que éste se diluye a 1:200.

El extracto de estípite de *Lactarius deliciosus* var. *salmonicolor* presenta un mayor bloqueamiento de la aglutinación, en presencia de suero, que el extracto de píleo; posiblemente esto sea debido a la menor concentración de lectina en estípite.

#### CUANTIFICACION PROTEICA DE SUERO NORMAL Y SUERO TRATADO CON EXTRACTO DE LACTARIUS INDIGO

Para observar si el bloqueamiento de aglutinación provocado por el suero se debe a un precipitado inespecífico o algo específico de proteínas, se decidió probar la diferencia en cuantificación proteica de un suero normal, con relación a un volumen del mismo suero que permaneció mezclado con el extracto en refrigeración durante 24 horas. Esto se hizo por simple análisis químico siguiendo el método siguiente:

1. En un tubo fue colocado 1.1 cc de suero.

2. En un segundo tubo se colocó 1.1 cc del mismo suero, más la cuarta parte de extracto, utilizándose el extracto de *Lactarius indigo* (0.275 cc). Los dos sueros fueron dejados en el refrigerador durante 24 horas, después de las cuales se observó el suero 1 sin precipi-

tado y el 2 con precipitado. Se centrifugó el número 2 desechando el precipitado, y el sobrenadante al igual que el suero 1 quedó listo para las pruebas siguientes:

El método empleado fue el fototurbidimétrico en el cual se hacen varias soluciones de fosfato, cada una con diferente dilución. Se utilizaron 6 tubos para observar primero el contenido proteico en el suero 1.

En el primer tubo se colocó un centímetro cúbico del suero correspondiente y 7.5 cc de una solución llamada patrón y 1.5 cc de agua destilada. En el tubo 2 se colocaron 10 cc de agua destilada. Como en el presente trabajo fue necesaria la electroforesis separando cada una de las fracciones proteicas, se utilizaron 4 tubos con soluciones de fosfato a diferente concentración diluidas progresivamente a partir del primer tubo; las soluciones fueron distribuidas de la siguiente manera:

1. 10 cc solución 1 de  $PO_4$
2. 10 cc solución 2 de  $PO_4$
3. 10 cc solución 3 de  $PO_4$
4. 10 cc solución 4 de  $PO_4$

El tubo patrón se mezcló varias veces y se le agregó 1 cc de la mezcla a cada uno de los tubos. Se esperó 15 minutos, después de los cuales se hicieron las lecturas de cada uno de los 4 tubos, comenzando por el más diluido; las lecturas se hicieron con filtro rojo ( $\lambda$  650) en el espectrofotómetro de Coleman.

Por otro lado, en un tubo se colocó 0.1 cc de suero más 5 cc de biuret y 4.9 de solución; se leyó el biuret con solución salina, utilizando filtro verde; generalmente la lectura inicial biuret fue de 11 ó 12. El biuret y el suero fueron mezclados y colocados durante media hora en la oscuridad; pasando este tiempo se volvieron a leer y a la lectura resultante se le restaron los 11 ó 12 iniciales. El resultado fue multiplicado por un factor biuret constante que es 0.064 y esto nos dio la cantidad de proteínas totales. El resultado de esta multiplicación dividido entre la lectura del tubo 1 nos dio el factor proteico.

Las lecturas en el espectro fotómetro de Coleman nos miden la densidad óptica.

Teniendo los resultados de los 4 tubos y el factor proteico, se prosiguió en la siguiente forma:

1. Lectura tubo 1 por factor = Proteínas totales.
2. Lectura tubo 1 - tubo 2  $\times$  factor = Albúminas.
3. Cantidad de Proteínas totales - Albúminas = globulinas totales.
4. Lectura tubo 2 - tubo 3  $\times$  factor =  $\alpha$ -globulinas.
5. Lectura tubo 3 - tubo 4  $\times$  factor =  $\beta$ -globulinas.
6. Lectura tubo 4  $\times$  factor =  $\gamma$ -globulinas.

Los resultados obtenidos son en gramos por 100 ml, pero las lecturas las reportamos en porcentajes, por simple regla de 3.

Hecho esto con el suero 1 se hace lo mismo con el sobrenadante número 2, y se comparan las diferencias en contenido proteico del suero normal y del que contiene extracto.

#### RESULTADOS EN SUERO NORMAL

Proteínas totales (biuret) = 8.384.

Factor =  $8.384 \div 39 = 0.214$ .

1. Proteínas totales =  $39 \times 0.214 = 8.346$ .
2. Albúminas =  $39 - 16 \times 0.214 = 4.922$  gr, 58.9%.
3. Globulinas totales =  $8.346 - 4.922 = 3.424$  gr, 41.02%.
4.  $\alpha$ -Globulinas  $16 - 11 \times 0.214 = 1.070$  gr, 12.82%.
5.  $\beta$ -Globulinas  $11 - 6 \times 0.214 = 1.076$  gr, 12.82%.
6.  $\gamma$ -Globulinas  $6 \times 0.214 = 1.284$  gr, 15.38%.

Resultados en suero con extracto de *Lactarius indigo*:

Proteínas totales (biuret) = 6.656.

Factor:  $6.65 \div 30 = 0.221$ .

1. Proteínas totales =  $30 \times 0.221 = 6.63$  gr.
2. Albúminas =  $30 - 13 \times 0.221 = 3.757$  gr, 56.6%.
3. Globulinas totales =  $6.63 - 3.757 = 2.873$  gr, 43.3%.
4.  $\alpha$ -Globulinas =  $13 - 9 \times 0.221 = 0.884$  gr, 13.3%.
5.  $\beta$ -Globulinas =  $9 - 5 \times 0.221 = 0.884$  gr, 13.3%.
6.  $\gamma$ -Globulinas =  $5 \times 0.221 = 1.105$  gr, 16.6%.

CONCLUSIÓN. Se muestra un precipitado completamente inespecifico de proteínas del suero con disminución en proteínas totales y en todos los tipos de proteínas fraccionadas.

El extracto precipita principalmente a la albúmina, lo cual se comprobó colocando en un capilar albúmina de huevo más extracto volumen a volumen, observándose un precipitado de +++.

La disminución en las proteínas fue la siguiente:

Proteínas totales	8.346	—	6.63	=	1.716	gr.
Albúminas	4.922	—	3.757	=	1.165	gr.
Globulinas	3.424	—	2.873	=	0.551	gr.
α-Globulinas	1.070	—	0.884	=	0.186	gr.
β-Globulinas	1.070	—	0.884	=	0.186	gr.
γ-Globulinas	1.284	—	1.105	=	0.179	gr.

Además se hicieron los siguientes experimentos con el fin de observar qué porción proteica es la reaccionante de la fitohemaglutinina.

De estudios recientes<sup>106</sup> se ha revelado que la porción euglobulínica con máxima actividad fitohemaglutinante corresponde a la gamma globulina.

Empleando gamma globulina pura, se presenta un exceso de lectina y, por consiguiente, la reacción debe quedar bloqueada si ésta es la porción reaccionante.

Se hicieron los siguientes experimentos con gamma globulina pura:

En un tubo de ensaye se colocaron 0.2 cc de gamma globulina y 0.2 cc de extracto de pileo de *Amanita caesarea*; en otro tubo 0.2 cc de gamma globulina y 0.2 cc de extracto de pileo de *Psilocybe caerulescens*, se dejaron en el refrigerador durante 24 horas y posteriormente se volvió a observar la titulación de cada uno con eritrocitos lavados comparándola con la inicial.

## RESULTADOS

*Psilocybe caerulescens* perdió totalmente la reacción con sangre A, B y O.

CONCLUSIÓN. El extracto desde un principio no presentaba aglutinación con sangre total, posiblemente en este caso la gamma globulina del suero actuó como inhibidora de la aglutinación ya que ésta parece ser la proteína reaccionante de la lectina.

*Amanita caesarea*. El extracto de pileo conservó la aglutinación en la misma forma en

que se mostraba anteriormente, reaccionando únicamente en forma algo más débil en el último de los tubos pero dando la misma titulación final.

Sangre "A" 1:1	++++	1:10	++	1:50 ±
Sangre "B" 1:1	++++	1:10	+	
Sangre "O" 1:1	++++	1:10	++	

CONCLUSIÓN. El extracto presenta aglutinación fuerte con sangre total observándose cómo la gamma globulina no bloquea; es posible que al haber quedado las reacciones iguales que inicialmente, la proteína reaccionante no sea gamma globulina sino cualquier otro tipo.

## INFLUENCIA DE ALGUNOS FACTORES FÍSICOS EN LA AGLUTINACION CON EXTRACTOS DE HONGOS

### 1. Efecto de la temperatura.

En las aglutininas de hongos no existe una forma generalizada de comportamiento frente a los diversos cambios de temperatura.

Se estudió el efecto de la temperatura en 6 extractos entre 4°C y 37°C.

Se colocó para el efecto un volumen dado de extracto a 4°C y otro a 37°C por 2 horas, después de las cuales se hizo la titulación en la forma habitual.

Los extractos de *Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, y *Amanita caesarea* (pileo y estípite), mostraron ser termoeestables no variando en ninguno la titulación ni a 4°C ni a 37°C.

Los otros 3 extractos estudiados son termolábiles presentando igual titulación a la inicial con temperaturas bajas, y disminución o pérdida de la aglutinación después de 2 horas a 37°C.

En extracto de ejemplar desecado de *Morchella esculenta* f. *vulgaris* se observó lo siguiente:

2Hs. Temp.	A. Sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++++	1:50	+	1:100 ±
4°C.	B. Sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++++	1:50	++	1:100 +
	O. Sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++++	1:50	+	1:100 ±

Después de 2 horas a 37°C se observaron cambios muy notables; pérdida total de la aglutinación con sangre total aun a concentraciones elevadas de extracto; con eritrocitos lavados hubo pérdida total de la aglutinación con sangre A y O y para B una aglutinación muy ligera.

### *Morchella esculenta* f. *vulgaris*

2Hs. Temp.	A. Sang. tot.	—	1:1	—					
37°C.	B. Sang. tot.	—	1:1	++++	1:10	—			
	O. Sang. tot.	—	1:1	—					

Como vemos, este extracto actúa fuertemente a bajas temperaturas y es inespecífico, aunque la aglutinación es más fuerte con sangre B. Al cambiarse la temperatura hay un cambio de especificidad, siendo el extracto un anti "B" muy débil; algo similar se ha publicado en *Marasmius oreades*<sup>29</sup> en que a 37°C es un anti "B" específico, mientras que a temperaturas más bajas reacciona con san-

gre A y O, pero en este caso, la aglutinación con sangre B no disminuye como sucede en *Morchella esculenta*, en la cual hay gran disminución de la aglutinación con todos los grupos sanguíneos, pero como inicialmente el extracto presenta mayor afinidad por sangre B, siendo la reacción más fuerte con este grupo, posiblemente este haga que persista reaccionando débilmente.

Extracto de *Helvella crispa*  
(ejemplar desecado)

4°C.	A. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++++	1:50	++	1:100	+	1:200	±	1:400	-
	B. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++++	1:50	++	1:100	+	1:200	±	1:400	-
	O. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++++	1:50	++	1:100	+	1:200	±	1:400	-
18°C.	Resultados iguales a los anteriores.													
37°C.	A. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++	1:50	±	1:100	±	1:200	-		
	B. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++	1:50	±	1:100	±	1:200	-		
	O. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++	1:50	+	1:100	±	1:200	-		

Después de estar 2 horas a 37°C la aglutinación disminuye a la mitad, además de que la fuerza de ésta es menor en todas las

diluciones, con sangre total la aglutinación es más fina que inicialmente. Esta fitohemaglutinina se desnaturaliza a 52°C.

Extracto de *Laccaria laccata*  
(píleo de ejemplar fresco).

4°C.	A. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	++	1:50	-
	B. sang. tot.	+	1:1	++++	1:10	+	1:50	-
	O. sang. tot.	+	1:1	+++	1:10	-		
37°C.	A. sang. tot.	+	1:1	++	1:10	-		
	B. sang. tot.	+	1:1	++	1:10	-		
	O. sang. tot.	+	1:1	±	1:10	-		

Extracto de *Laccaria laccata* (estípite).

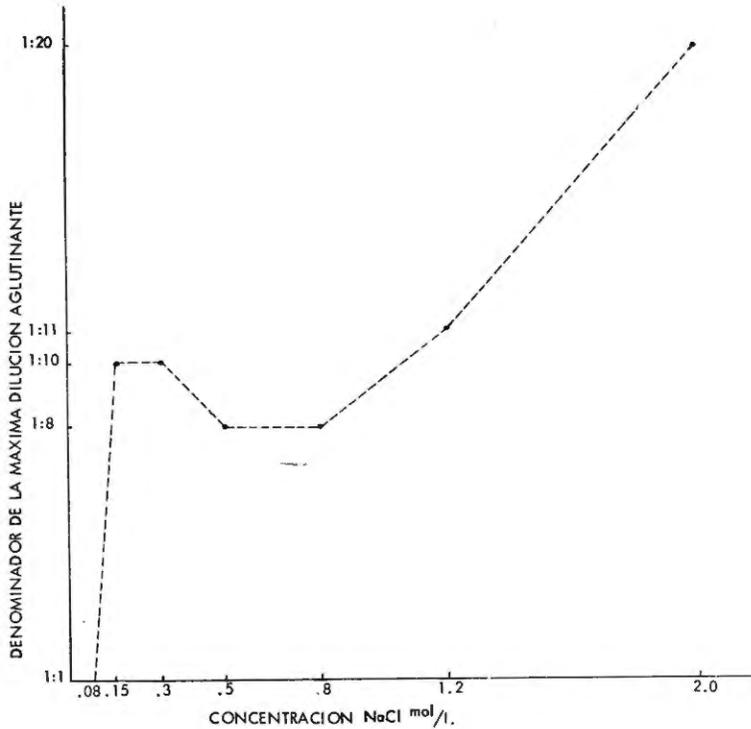
4°C.	A. sang. tot.	-	1:1	++	1:10	-
	B. sang. tot.	-	1:1	+++	1:10	-
	O. sang. tot.	-	1:1	+	1:10	-
37°C.	Se presenta pérdida total de la aglutinación con eritrocitos lavados.					

En los 3 hongos anteriores observamos que la aglutinación es bastante dependiente de la temperatura, teniendo su óptimo a temperaturas entre 4 y 25°C por arriba de las cuales comienza a descender. Esto contrasta con las fitohemaglutininas de semillas en las que el fenómeno es independiente de los cambios de temperatura.

EFEECTO DE CONCENTRACION  
DE ELECTROLITOS

Una cierta cantidad de electrólitos es necesaria para que la hemaglutinación se lleve a cabo.

Para hacer pruebas con concentraciones hipotónicas de sal, las diluciones de los extractos fueron hechas en agua destilada. Los eritrocitos se suspendieron en soluciones de concentración entre 0 y 1.8% de NaCl. Para las pruebas con concentraciones hipertónicas las diluciones se hicieron entre 0.15M y 2.6M de NaCl y los eritrocitos fueron suspendidos en soluciones de NaCl de igual concentración.



Gráfica 1.

Se observó que al disminuir la concentración de NaCl a menos de 0.9% (0.15M) la titulación disminuye progresivamente; entre 0.15 y 0.8M hay una disminución muy ligera para volver a aumentar de 0.8M en adelante. No se observó el efecto de otras sales aparte de NaCl.

Lo anteriormente dicho fue observado en 3 extractos de hongos estudiados. Observamos que entre las concentraciones de NaCl con mayor titulación está la de 8.5% que es la que utilizamos todo el tiempo para hacer los extractos.

Con extracto de *Laccaria laccata* a concentración de NaCl 0.08M casi se pierde la aglutinación presentando la titulación siguiente:

A.	1:1	+	1:10	-
B.	1:1	+	1:10	--
O.	1:1	±	1:10	-

A 0.15M la titulación aumenta casi a su máximo.

A.	1:1	+++	1:10	+
B.	1:1	+++	1:10	+
O.	1:1	++	1:10	-

A 0.8M disminuye ligeramente.

A.	1:1	++++	1:10	±
B.	1:1	++++	1:10	±
O.	1:1	+++	1:10	-

A 1.2M presenta su máximo.

A.	1:1	++++	1:10	+++
B.	1:1	++++	1:10	++
O.	1:1	+++	1:10	-

Lo anterior se observa en la gráfica número 1.

#### EFFECTO DEL pH

Para ver el efecto del pH los eritrocitos fueron suspendidos en soluciones amortiguadas.

doras; en la mezcla de extracto de hongo y solución amortiguadora en la que estaban suspendidos los eritrocitos se leyó el pH; la medición de pH fue hecha con simple papel indicador de 3 colores, por lo que está sujeta a bastante error.

Únicamente se trabajaron los extractos de *Helvella crispa* y *Morchella esculenta* f. *vulgaria*.

Se utilizaron las siguientes soluciones amortiguadoras:

Para pH4 : pH6 = 0.15M CH<sub>3</sub>COOH + 0.15M CH<sub>3</sub>COONa

Para pH5.5 : pH8.5 = 0.12M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Para pH8.5 : pH11.5 = 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.15M NaOH

Los 2 extractos aglutinaron con la misma titulación inicial entre límites muy amplios de pH, entre 5 y 10, con cierta disminución al acercarse a los extremos.

#### RESULTADOS OBTENIDOS EN LIQUENES

Especie	Grupos Sang.	Sang. tot.	1:1	1:10
<i>Usnea florida</i>	—			
<i>Evernia</i> sp.	—			
<i>Evernia</i> sp.	—			
<i>Evernia furfuracea</i>	A	—C(2)	++	—
	B	—C(2)	++	—
	O	—C(2)	++	—
<i>Parmelia</i> sp.	—			
<i>Peltigera canina</i>	A	—	+	—
	B	—	+	—
	O	—	++	—

#### DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LIQUENES

Se contó con muy pocos especímenes y, además, con una cantidad muy reducida de cada uno de éstos, por lo que fue necesario en todos los casos molerlos en mortero.

La mayoría de los líquenes pudieron ser molidos con bastante facilidad; de 6 especies estudiadas solamente 2 presentaron aglutinación débil; los resultados de la aglutinación en todos los casos dependen de la mayor o menor transferencia del factor aglutinante en el filtrado, pero como todas las especies fueron fáciles de moler, no consideramos que la ausencia de aglutinina sea debida a menor transferencia del factor aglutinante.

En el caso de *Peltigera canina*, nuestros resultados no coinciden con los reportados por Estola,<sup>28</sup> en que la misma especie llega a tener titulaciones de más de 1:800, su método es similar al nuestro, pero varía en la concentración de solución salina empleada para hacer el extracto, ya que ellos utilizan solución fisiológica. Nosotros lo hicimos en esta forma, y los resultados fueron idénticos a los iniciales; quizá la variedad del líquen estudiado por Estola fue diferente de la nuestra.

#### RESULTADOS OBTENIDOS CON ESPORAS DE HELECHOS

Especie	Grupos Sang.	Sang. tot.	1:1	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<i>Tectaria trifoliata</i>	—								
<i>Polystichum cuculeatum</i>	—								
<i>Hemionitis palmata</i>	A	+	++++	++	+	—			
	B	+	++++	+	—				
	O	+	++++	+	—				

## RESULTADOS OBTENIDOS CON ESPORAS DE HELECHOS

(Continuación)

<i>Hemitelia costaricensis</i>	—								
<i>Alsophila myosuroides</i>	—								
<i>Cyathea princeps</i>	A <sub>1</sub>	—							
	A <sub>2</sub>	+(F)	++	++	++	±	—		
	B	+(F)	++	++	++	±	—		
	O	+(MF)	++++	++++	++++	++	+	±	—
<i>Cyathea fulva</i>	A	+	++	+	±	—			
	B	+	++	+	±	—			
	O	+	++	+	±	—			

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON ESPORAS DE HELECHOS

En primer lugar, es necesario hacer notar que existe un cierto error en el método seguido, ya que se diluyó directamente al 10% la cantidad inicial de esporas y como, al utilizarlas para el extracto, no todas estaban rotas, la cantidad de fitohemaglutinina presente se hallaba disminuida al igual que la proporción de fitohemaglutinación, que es directamente proporcional a ésta, obteniéndose titulaciones menores.

En dos especies de *Cyathea* y una de *Alsophila* perteneciente también a la familia Cyatheaceae así como en *Hemitelia*, también de esta familia, se observaron diferencias químicas muy evidentes por lo que respecta a la aglutinación.

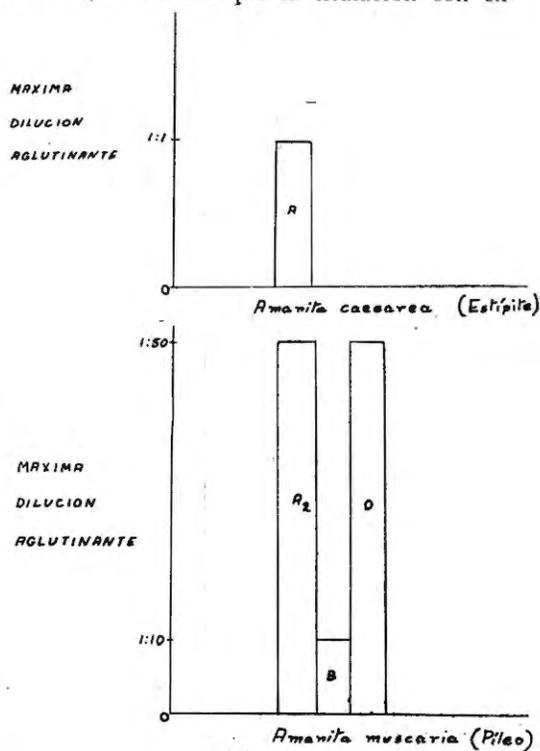
*Cyathea princeps*, aunque aparentemente presenta reacción inespecífica, tiene una mayor afinidad anti "H" presentando en todas las diluciones aglutinación más fuerte con sangre O y A<sub>2</sub> y una titulación 4 veces mayor con estos grupos sanguíneos que con sangre A y B.

Con este extracto se hicieron estudios de absorción; al ser absorbido el extracto con sangre A o B, se pierde la aglutinación con estos dos grupos y disminuye notablemente la aglutinación con sangre O, mostrándonos esto la homogeneidad de la lectina al igual que las de los hongos.

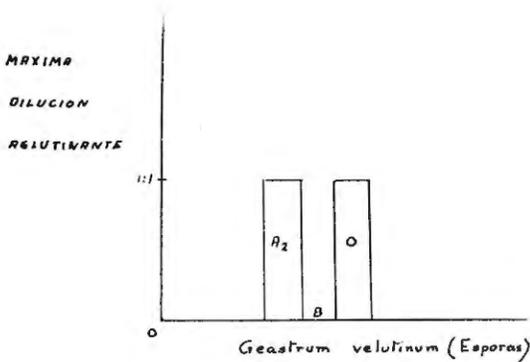
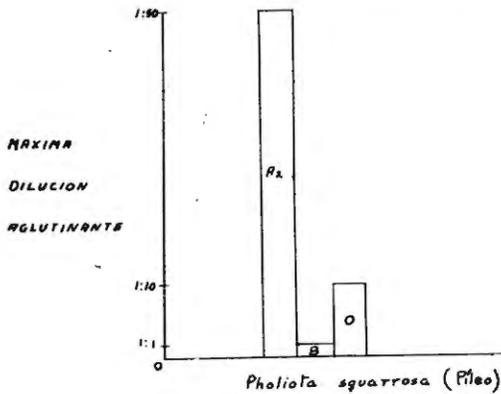
Resultados obtenidos después de la absorción durante 24 horas con sangre A o B.

A. 1:1	—	1:10	—	1:50	—	1:100	—
B. 1:1	—	1:10	—	1:50	—	1:100	—
O. 1:1	++++	1:10	+++	1:50	±	1:100	—

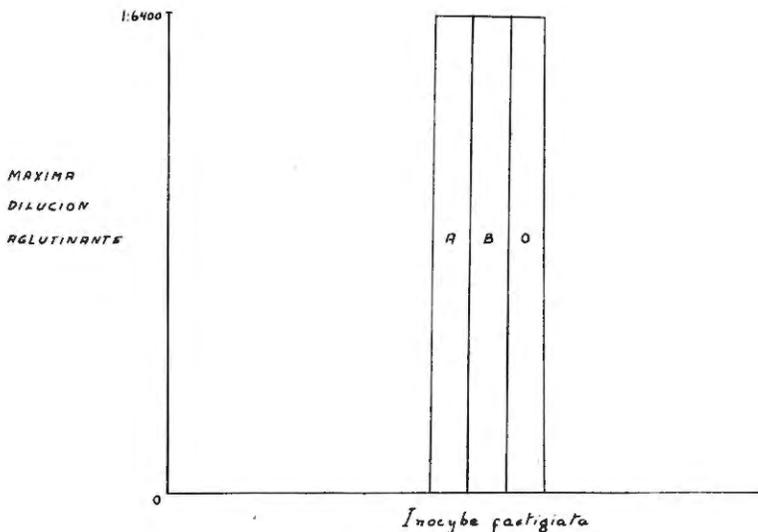
Si la absorción se hace con sangre O la aglutinación se pierde totalmente para todos los grupos, lo cual nos indica que la capacidad de absorción es más elevada con eritrocitos O, lo mismo que la titulación con ex-



Gráfica 2.



Gráfica 3.



Gráfica 4.

tracto no absorbido es más elevada con este grupo sanguíneo. Esto nos comprueba aún más la especificidad de esta lectina.

*Cyathea fulva*. A diferencia de la anterior, es completamente inespecífica y con cualquier grupo sanguíneo con el que se absorba se pierde la titulación de los demás.

Como se observa, *Cyathea princeps*, *Cyathea fulva* y *Alsophila myosuroides* pueden ser fácilmente diferenciadas por este fenómeno.

*Hemionitis palmata*. Presenta una mayor afinidad hacia el aglutinógeno "A", reaccionando en forma más intensa con éste.

#### CONCLUSIONES Y DISCUSION GENERAL

1. La incidencia de estas sustancias fue mayor en hongos de la clase Basidiomycetes, subclase Homobasidiomycetidae.

2. Se encontraron varias lectinas específicas, la mayoría de las cuales son anti "A" y anti "H"; no se encontró ningún anti "B". No existe una explicación clara que justifique la presencia de un mayor número de extractos vegetales con lectinas anti "A" que con lectinas anti "B".

En el presente estudio encontramos las siguientes lectinas con especificidad absoluta, que al parecer no han sido reportadas anteriormente ya que no fueron encontradas en nuestra revisión bibliográfica.

## ANTI "A"

Extracto de estípite de *Amanita caesarea* (reacción débil).

## ANTI "H"

Extracto de píleo de *Amanita muscaria*.

Extracto de *Gastrum velutinum* "esporas" (reacción débil).

Extracto de píleo de *Pholiota squarrosa*.

El resto de los extractos con lectinas fueron inespecíficos o con especificidad relativa.

Del estudio inmunológico llegamos a las siguientes consideraciones:

3. Estas sustancias posiblemente no deban ser consideradas como anticuerpos; ya que no parecen formarse por estimulación antigénica de ningún tipo, es imposible pensar que las plantas hayan sido expuestas a los antígenos sanguíneos con las cuales reaccionan.

Consideramos más bien que una cierta fitohemaglutinina accidentalmente posee una configuración que es complementaria a los grupos químicos del antígeno sanguíneo, y debido a que en los distintos antígenos sanguíneos hay ciertos grupos químicos comunes, la aglutinina puede ser más o menos complementaria de uno o más grupos sanguíneos, y por este origen accidental observamos la rareza de la existencia de aglutininas totalmente específicas, y la presencia en numerosos casos de reacciones cruzadas con un par de antígenos y, en otros, reacción cruzada con un antígeno diferente.

Los tipos de especificidad quizá estén dados en varios grados de afinidad por diferentes antígenos de una misma molécula; en el caso en que presentamos titulaciones bajas quizá haya menor afinidad de la lectina para los puntos de combinación de la célula y, por lo tanto, la correspondencia entre grupos activos de lectina y célula es menor.

4. Por los estudios de absorción concluimos que las lectinas son más homogéneas que las isoaglutininas, dado que al ser absorbidas con un antígeno sanguíneo para eliminar la actividad de éste, disminuye en la misma proporción la actividad con los antígenos restantes, principalmente en los extractos que presentan lectinas inespecíficas.

5. El suero actúa como factor inhibidor de la reacción en la mayor parte de los casos,

y en algunos, especialmente en hongos, bloquea totalmente su presencia; esto se observó haciendo el estudio con sangre total. Se comprobó que este fenómeno es debido a un precipitado inespecífico de proteínas del suero, que reaccionan con el mismo componente de la lectina que va a intervenir en la aglutinación, observándose el siguiente tipo de reacciones:

	Sangre total	Glóbulos lavados	Precipitación con proteínas del suero
1	+	+	+
2	+	-	±
3	-	+	- (sólo detectable microscópicamente).
4	-	+	+
5	-	-	-

De los estudios de la influencia de factores físicos en la aglutinación concluimos lo siguiente:

6. El fenómeno muestra una gran independencia de reacción con los cambios de factores físicos como temperatura y pH, no variando marcadamente dentro de amplios límites de estos factores. La concentración de electrólitos es un factor más decisivo en la presencia de reacción.

Llegamos a las siguientes conclusiones botánicas:

7. La presencia de fitohemaglutinina, así como su mayor o menor especificidad, varía grandemente en especies de un mismo género y aun en variedades de una misma especie, persistiendo esta diferencia aunque variedades de una misma especie se desarrollen en idénticas condiciones ecológicas.

Estos cambios son probablemente debidos a diferencias cromosómicas como ha sido demostrado por Renkonen y Therman.<sup>84</sup>

8. Consideramos que en varios casos la presencia de fitohemaglutininas sea una propiedad individual en vegetales.

9. Se encontraron también diferencias en la presencia de estas sustancias en las diversas estructuras de una misma especie y variedad, como en el caso de los hongos, en que algunas veces se encontraron variaciones de la reacción con extractos de píleo, estípites y esporas.

10. Observamos que cambios ecológicos, en algunos casos, originan cambios en la concentración de lectina o bien influyen en la presencia o ausencia de reacción, como sucede en *Lycoperdon pyriforme* y en *Geastrum saccatum*.

11. Debido a la variación de contenido de lectinas en distintas variedades, consideramos que la aglutinación constituye un auxiliar de bastante precisión en la clasificación, ya que las diferencias de reacción nos dan diferencias estructurales de las proteínas de una determinada especie y variedad, que en ocasiones no se puede diferenciar morfológicamente de otra.

12. En general, las aglutininas se encontraron en las partes de la planta donde las proteínas se acumulan como sustancias de reserva.

13. Obviamente las fitohemaglutininas no son elaboradas por la planta con la finalidad de aglutinar eritrocitos; la forma en que se realiza la reacción, debe ser una manifestación de propiedades fisiológicas de determinado valor en el metabolismo vegetal.

La mayoría de las fitohemaglutininas contienen carbohidratos y si consideramos que se combinan con monosacáridos del eritrocito, observamos con esto su afinidad por los carbohidratos, y posiblemente en la planta sirvan como fijadores de este tipo de sustancias, permitiéndole tener reservas de ellas.

La participación de estas sustancias en el metabolismo vegetal no se ha esclarecido aún, y se requieren numerosos estudios para saber su función precisa en vegetales.

#### LUGARES DE COLECCION DE LOS HONGOS ESTUDIADOS

1. *Cordyceps capitata*. Tenango del Valle, Méx., Ag. 29, 1965.
2. *Sarcosphaera coronaria*. Salazar, Méx., Oct. 6, 1960.
3. *Otidea leporina*. Salazar, Méx., Bosque de oyameles (*Abies religiosa*), Sep. 1, 1965.
4. *Morchella conica*. Mercado de Medellín, Méx., D. F. Nov. 2, 1960.
5. *Morchella esculenta*. Desierto-La Venta, Bosque de oyameles, Nov. 20, 1961.
6. *Helvella elastica*. Cerro de Tetequilo, Topilejo, D. F., Sep. 2, 1956.
7. *Helvella crispa*. El Zarco, D. F., Oct. 10, 1953.
8. *Helvella lacunosa*. San Pedro Nexapa (faldas del Popocatepetl), Ag. 1964.
9. *Tremella lutescens*. Barranca de Mexicapa (oeste de Cuernavaca). En Tronco Viejo, 2 800 m, Dic. 12, 1963.
10. *Phlogiotis helvelloides*. Salazar, Bosque de *Abies religiosa*, Sep. 1, 1965.
11. *Auricularia polytricha*. Salazar, Méx., Ag. 11, 1960.
12. *Auricularia auricula*. Cerro Tláloc, Bosque de pinos, s. f.
13. *Auricularia fuscosuccinea*. Telapón, Pue., Bosque de pinos, Jul. 7, 1963.
14. *Ustilago maydis*. Mercado Juárez, Méx., D. F., Jul. 1965.
15. *Clavaria truncata*. Cerro Santa Cruz, La Marquesa, Méx., Sep. 18, 1960.
16. *Clavaria pistillarlis*. Tenango del Valle, Méx., Ag. 29, 1965.
17. *Clavaria stricta*. Paso de Cortés, Méx., Bosque de oyameles, Sep. 8, 1957.
18. *Clavaria aurea*. Tenango del Valle, Méx., Ag. 19, 1956.
19. *Clavaria botrytis*. Desierto de los Leones, Ag. 1964.
20. *Sarcodon laevigatum*. Villa Guerrero, Méx., Oct. 2, 1960.
21. *Coriolus abietinus*. Desierto de los Leones, D. F., Ag. 29, 1965.
22. *Ganoderma lucidum*. Mocombo, Ver., Sep. 1, 1961.
23. *Polyporus cinnabarinus*. Sierra de la Ventana, Son., Encinar de *Quercus arizonica*, May. 27, 1965.
24. *Ungulina marginata* var. *pinicola*. Desierto de los Leones, Ag. 1964.
25. *Pycnoporus sanguineus*. Sierra de la Ventana, Son., Encinar de *Quercus arizonica*, May. 27, 1965.
26. *Boletus brevipes*. Río Frío, Bosque de pinos, Jul. 26, 1964.
27. *Boletus edulis*. Mercado Juárez, Méx., D. F., Jul. 1964.
28. *Sparassis laminosa*. Atotonilco el Chico, Hgo., Oct. 8, 1961.
29. *Stereum hirsutum*. Tepozteco, Mor., Bosque de encinos, Sep. 20, 1962.
30. *Stereum ostrea*. Cuautla, Mor., Jun. 24, 1960.
31. *Agaricus bisporus*. Mercado Juárez, Méx., D. F., Ag. 1964.
32. *Agaricus placomyces*. Mercado Juárez, Méx., D. F., Jul. 1965.
33. *Amanita caesarea*. Mercado Juárez, Méx., D. F., Jul. 1964.
34. *Amanita muscaria*. Salazar, Cerro de la Campana, 3 100-3 380 m, Ag. 21, 1960.
35. *Amanita pantherina*. Salazar, Cerro de las Palmas, Bosque de encinos, pinos y madroños, entre 2 800-3 000 m, Ag. 2, 1964.

36. *Amanita vaginata*. San Pedro Nexapa (faldas del Popocatepetl), Ag. 1964.
37. *Cantharellus floccosum*. Río Frío, Bosque de pinos, Jul. 26, 1964.
38. *Cantharellus cibarius*. Mercado Juárez, D. F., Ag. 1964.
39. *Clitocybe infundibuliformis*. Mercado Juárez, Méx., D. F., Ag. 1964.
40. *Cortinarius purpurascens*. Salazar, Méx., Bosque de oyameles, Sep. 1, 1965.
41. *Gomphidius viscidus*. Salazar, Méx., Bosque de pinos, Sep. 1, 1965.
42. *Hygrophorus chrysodon*. Salazar, Méx., Bosque de oyameles, Sep. 1, 1965.
43. *Inocybe fastigiata*. Salazar, Bosque de oyameles, Sep. 25, 1960.
44. *Inocybe lilacina*. Salazar, Méx., Bosque de pinos, Sep. 1, 1965.
45. *Laccaria laccata*. San Pedro Nexapa (faldas del Popocatepetl), Ag. 1964.
46. *Lactarius deliciosus*. Mercado de Amecameca, Méx., Ag. 1964.
47. *Lactarius indigo*. Mercado de Amecameca, Méx., Ag. 1964.
48. *Lepiota procera*. Salazar, Méx., Bosque de oyameles, Sep. 1, 1965.
49. *Naematoloma fascicularis*. Salazar, Méx., Cerro de las Palmas, 2800-3000 m, Bosque de encinos, pinos, madroños, Ag. 2, 1964.
50. *Psilocybe cubensis*. Huautla de Jiménez, Oax., Sep. 4, 1959.
51. *Psilocybe caerulea*. Huautla de Jiménez, Oax., Jun. 30, 1965.
52. *Psilocybe mexicana*. Huautla de Jiménez, Oax., Jun. 30, 1965.
53. *Psilocybe muliercula*. Tenango del Valle, Ag. 29, 1965.
54. *Pholiota squarrosa*. Salazar, Méx., Bosque de oyameles, Sep. 1, 1965.
55. *Russula sanguinea*. Río Frío, Méx., Bosque de pinos, Jul. 26, 1964.
56. *Russula delicata*. San Pedro Nexapa (faldas del Popocatepetl), Ag. 1964.
57. *Schizophyllum commune*. Rincón Viejo, Gro., Nov. 3, 1963.
58. *Lycoperdon pyriforme*. Desierto de los Leones, Bosque de oyameles, Nov. 16, 1958.
59. *Lycoperdon pyriforme*. Cerro de San Nicolás (Salazar, Méx.), Bosque de oyameles, Ene. 14, 1962.
60. *Lycoperdon perlatum*. Cerro de los Tepalcates, El Zarco, Bosque de oyameles, 3150 m, Jul. 15, 1956.
61. *Lycoperdon stellare*. Sierra de las Cruces; Cerro Cabezas, Bosques de oyameles y pinos, 3450 m, Nov. 1963.
62. *Lycoperdon umbrinum* var. *umbrinum*. Salazar, Méx., Bosque de coníferas, Dic. 2, 1955.
63. *Lycoperdon umbrinum* var. *floccosum*. Paso de Cortés, 3050-3200 m, Bosque de oyameles y pinos, Sep. 8, 1957.
64. *Geastrum floriforme*. Cerro de la Estrella, D. F., Ag. 12, 1956.
65. *Geastrum triplex*. Paso de Cortés, Bosque de oyameles, Sep. 8, 1957.
66. *Geastrum velutinum*. Desierto de los Leones, Bosque de oyameles, Ag. 17, 1958.
67. *Geastrum saccatum*. Salazar, Cerro de las Palmas, Bosque de encinos, Oct. 20, 1959.
68. *Geastrum saccatum*. Sierra de Guadalupe, Cerro de Santa Isabel, Jun. 21, 1956.
69. *Scleroderma lycoperdoides*. Desierto de los Leones, Ag. 15, 1959.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abel, J. J. & Ford, W. W. On the poisons of *Amanita phalloides*. *J. Biol. Chem.* Vol. 2, p. 273.
2. Aladjem, F. & Lieberman, M. 1952. The antigen-antibody reaction. I. The influence of sodium chloride concentration on the quantitative precipitin reaction. *J. Immunol.* Vol. 69, p. 117.
3. Assman, F. 1911. Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Agglutinine. *Arch. f. d. ges. Physiol.* Vol. 137, pp. 489-510.
4. Berenheimer, A. W. & Farkas, M. E. 1953. Hemagglutinins among higher fungi. *J. Immunol.* Vol. 70, p. 197.
5. Bird, G. W. G. 1951. Specific agglutinating activity for human red blood corpuscles in extracts of *Dolichos biflorus*. *Curr. Sc.*, Vol. 20, p. 298.
6. Boyd, W. C. 1956. *Fundamentals of Immunology* (Third Edition). Interscience Publishers, Inc., New York.
7. Boyd, W. C. 1962. *Introduction to Immunological Specificity*. Interscience Publishers, Inc.
8. Boyd, W. C. 1949. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J. Immunol.* Vol. 62, p. 333.
9. Boyd, W. C. 1950. Hemagglutinating substances for human cells in various Egyptian plants. *J. Immunol.* Vol. 65, p. 281.
10. Boyd, W. C. 1952. *Fed. Proc.* Vol. 11, p. 462.
11. Boyd, W. C. 1954. Effect of pressure on a plant agglutinin. *J. Amer. Chem. Soc.* Vol. 76, p. 4026.
12. Boyd, W. C. & Shapleigh, 1954. *Blood*. Vol. 9, p. 1195.
13. Boyd, W. C. & Shapleigh, 1954. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with "lectins". *J. Immunol.* Vol. 73, p. 226.
14. Boyd, W. C. & Shapleigh, 1954. Diagnosis of subgroups of blood groups A and B by use of plant agglutinins (lectins). *J. Lab. Clin. Med.* Vol. 44, p. 235.
15. Boyd, W. C. & Shapleigh, 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*. Vol. 119, p. 419.
16. Boyd, W. C. 1955. *Rev. Hémat.* Vol. 10, p. 428.

17. Boyd, W. C. 1955. Immunochemical behaviour of a plant agglutinin (Lectin). *Arch. Biochem.* Vol. 55, p. 226.
18. Cazal, M. & Lalaurie, M. 1952. Recherches sur quelques phytoagglutinins spécifiques des groupes sanguins ABO. *Acta Haemat.* Vol. 8, p. 73.
19. Craeger, W. 1952. *Blood.* Vol. 7, p. 721.
20. Cugudda, E. G. & Massentis, G. 1953. *Minerva Med.* Vol. 44, p. 140.
21. Dujarric de la Rivière, R., Saint. Paul M., & Eyquem, A. 1953. Hémagglutinines végétales, antigènes végétaux et antisérums homologues. C. R. *Acad. Sci.* (Paris). Vol. 237, p. 211.
22. Dujarric de la Rivière, R., Saint. Paul M. & Eyquem, A. 1955. C. R. *Acad. Sci.* (Paris). Vol. 240, p. 576.
23. Durham, H. E. 1911. Some theoretical considerations upon the nature of agglutinins. *J. Exp. Med.* Vol. 5, pp. 353-388.
24. Dunsford, I. & Hutchison. 1953. Hemagglutinins from certain seed extracts and their behaviour with the subgroups A<sub>3</sub>B and A<sub>4</sub>. *Vox Sanguinis.* Vol. 3, p. 6.
25. Dvorak, 1960. Nonspecific inhibiting factor in human serum. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 120, p. 186.
26. Ehrlich, P. 1901. Schlussbetrachtungen in Nothnagets Handb. Spez. Path. u. Ther. 8. Citado por H. Sachs y A. Klopstock in Abderhaldens Handb. d. biologischen Arbeitshoden. Abt. XIII. Vol. 2 II. p. 840.
27. Eisler, M. & V. Portheim, L. 1912. Über ein Hämagglutinin in Pflanzen. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 66, p. 309.
28. Elo, J. & Estola, E. 1955. Haemagglutinins in Lichens. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* Vol. 33, p. 392.
29. Elo, J. & Estola, E. & Malmstrom, N. 1951. On Phyttagglutinins in Mushrooms. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* Vol. 29, p. 297.
30. Elo, J., & Estola, E. 1952. *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.* Vol. 30, p. 165.
31. Engler. 1954. Syllabus Der. Pflanzen Familien Band I II.
32. Eyquem, A. Saint Paul M., & Magnin J. 1955. *Ann. Inst. Pasteur.* Vol. 89, p. 60.
33. George, W. F., & Hirschhorn, E. The Ustilaginales or "Smuts" of Washington.
34. Fink, B. The Lichen Flora of the United States. Ann Harbor, The University of Michigan Press.
35. Ford, W. W. 1906. The toxins and antitoxins of poisonous mushrooms (*Amanita phalloides*). *J. infect dis.* Vol. 3, S. 191.
36. Friedberg, E. & Brossa, G. A. 1912. Über die Wirkung von Pilzextrakten. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 15, pp. 506-517.
37. Friedemann, U. 1909. Weitere Untersuchungen über den Mechanismus der Anaphylaxie. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 2, pp. 591-641.
38. Furihata, R. J. 1951. *Biochem.* (Tokyo). Vol. 38, p. 361.
39. Gómez P. y Herrera, T. 1965. Sistemática, Histología y Ecología de los Hongos del Género *Helvella*, del Valle de México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* Vol. 29, pp. 1-18.
40. Grabar, P. 1958. The use of immunochemical methods in studies on proteins. *Advances in Protein Chem.* Vol. 13, p. 1.
41. Hanson. 1960. A method of determining Electrophoretic Mobilities of Antibodies. *Experientia.* Vol. 16, pp. 327-329.
42. Heidelberger, M. 1939. *Bacteriol. Revs.* Vol. 3, p. 49.
43. Hermann, W. 1953. Discussion Note to the Article of M. Krüpe. *Zbl. Bakt; I Abt.* Vol. 160, p. 289.
44. Herrera, T. 1964. Clasificación, descripción y relaciones ecológicas de *Gasteromicetos* del Valle de México. *An. Inst. Biol. Univ. Méx.* Vol. 35, (1 y 2), pp. 9-43.
45. Herrera, T. y Guzmán, H. G. 1962. Taxonomía y Ecología de los principales Hongos comestibles de diversos lugares de México. *An. Inst. Biol. Univ. Méx.* Vol. XXXII (1 y 2), pp. 33-135.
46. Hummel, K. 1955. *Abl. Bakt. Abt. I.* Vol. 155, p. 1.
47. Kabat, E. A. & Leskowitz, S. 1955. *Fed. Proc.* Vol. 14, p. 467.
48. Kabat, E. A. & Leskowitz, S. 1955. *J. Amer. Chem. Soc.* Vol. 77, p. 5159.
49. Kabat, E. A. 1956. Blood group Substances. Their Chemistry and Immunochemistry. *Academic Press Inc.* New York.
50. Kobert, R. 1900. *Arch. des Vereins d. Freunde de. Naturgesch in Mecklenburg.* p. XIII.
51. Kossoritchn & Canat, J. J. 1941. *C. R. Soc. Biol.* (Paris). Vol. 135, p. 1100.
52. Kräus, R. 1902. Zur Theorie der Agglutination. *Z. Heilkunde.* Vol. 23, p. 369.
53. Kräus, R. & Ludwig, S. 1902. Über Bakterienhämagglutination und Antihämagglutination. *Wien Klin. Wschr.*, Vol. 120, p. 121.
54. Krüpe, M. 1950. Über Anti-O-Hämagglutinine pflanzlicher Herkunft (Beitrag zum Problem der menschlichen serologischen Bluteigenschaft O). *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 107, p. 450.
55. Krüpe, M. & Powillete, E. 1952. *Z. Hyg. Infektr.* Vol. 134, p. 198.
56. Krüpe, M. & Braun, C. 1952. *Naturwissenschaften.* Vol. 39, p. 284.
57. Krüpe, M. 1953. Die A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> Untergruppenbestimmung mit Hifepflanzlicher Hämagglutinine. *Zbl. Bakt. Abt. I.* Vol. 160, p. 289.
58. Krüpe, M. 1953. *Biol. Zbl.*, Vol. 72, p. 424.
59. Krüpe, M. 1953. *Z. Hyg. Infektr.*, Vol. 138, p. 167.
60. Krüpe, M. 1953. Inkomplette Hämagglutinine in Pflanzenextrakten. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. III, S. 22-31. (Univalente Hämagglutinine in Pflanzenextrakten. *Atti del VI. Congr. intern. di Microbiol. Roma, 6-12. Sttr.* Vol. 2, Sez. VI-VII. S. 305-311.
61. Krüpe, M. 1954. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. III, p. 22.
62. Krüpe, M. 1955. Über die Reaktionsfähigkeit pflanzlicher Hämagglutinine mit wasserlöslichen Blutgruppenmucoiden und einfacher gebauten Kohlenhydratmolekülen. *Seyt. Z. Physiol. Chem.* Vol. 299, p. 277.
63. Krüpe, M. 1956. Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweisskörper (Phytoagglutinine). Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart.

64. Krüpe, M. & Dodzer, W. 1957. Blood Group A<sub>1</sub>. *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.* Vol. 35, p. 1.
65. Kuhns, W. J. & Boiley, A. 1950. *Amer. J. Clin. Path.* Vol. 20, p. 1067.
66. Landsteiner, K. 1902. Beobachtungen über Hämagglutination. *Wien. Klin. Rdsch.* S. 774.
67. Landsteiner, K. & Raubitschek, H. 1909. Über Adsorption von Immunstoffen. *Biochem. Z.* Vol. 15, p. 33.
68. Landsteiner, K. & Miller, C. P. 1925. *J. exp. Med.* Vol. 12, p. 853.
69. Landsteiner, K. 1947. The specificity of Serological Reactions. Harvard University Press Cambridge, U. S. A.
70. Lau, C. 1911. Über Vegetabilische Blutagglutinine. Inaug. Dis. Rostok.
71. Levine, P., Ottensooser, F., Celano, M. J. & Pollitzer, W. 1955. *Amer. J. Phys. Anthropol.* Vol. 13, p. 29.
72. Mäkella, O., Mäkella, P. & Linkola, 1958. Reactions of Plant anti N. Agglutinins with red cells treated with proteolytic enzymes. *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.* Vol. 36, p. 323.
73. Mäkella, O. & Mäkella, P. 1959. Sugar specificity of plant haemagglutinins (Lectins). *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.* Vol. 37, p. 328.
74. Marchal, J. G. 1942. Agglutinines normales chez les végétaux. *C. R. Soc. Biol.* (Paris). Vol. 136, p. 760.
75. Mohn, J. F. 1956. Sixth Congress of the International Society of Blood transfusion, Boston.
76. Neter, E. 1956. Bacterial Hemagglutination and Hemolysis. *Bact. Rev.* Vol. 20, p. 166.
77. Nungester, W. J. & Van Halsema, G. 1953. *Proc. Soc. exp. Biol.* Vol. 83, p. 863.
78. Ottensooser, F. & Lenzinger, A. 1933. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 81, p. 354.
79. Ottensooser, F. 1955. *Arch. Biol.* (S. Paulo). Vol. 39, p. 76.
80. Ottensooser, F. 1955. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias.* Vol. 27, p. 519.
81. Punin, W. 1952. Über den Wirkungsmechanismus der pflanzlichen anti-O-agglutinine. *Z. Naturf.* Vol. 7b, p. 48.
82. Raubitschek, H. & Silenko, M. 1910. Über den Zusammenhang der Hämagglutinierenden u. präzipitierenden Fähigkeit pflanzlicher Antigene. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 5, p. 446.
83. Raubitschek, H. & Wilenko, M. 1914. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 9, p. 297.
84. Renkonen, K. O. & Therman, E. 1952. Chromosome number and Anti-A<sub>1</sub>-agglutinins in seeds of *Vicia cracca*. *Ann. Med. exp. Biol. Fenn.* Vol. 30, p. 327.
85. Rosenthal, L. 1943. Agglutinating properties of *Escherichia coli*. *J. Bact.* Vol. 45, p. 545.
86. Sievers, O. 1927. Studier över isoagglutination. Inaug. Diss. Helsingfors. p. 16.
87. Tobiska, 1960. Nonspecific inhibitors of phytäggglutination. *Z. Immunitaetsforsch.* Vol. 119, pp. 231-243.
88. Tong, M. J. & Fong, J. 1964. Immunologic studies of purified viral hemagglutinin. *J. Immunol.* Vol. 93, p. 35.
89. Wiener, A. S. & Wiener, I. B., 1952. The mosaic structure of red blood cell agglutinogens. *Bact. Rev.* Vol. 16, p. 69.