

“COMPARACION DE ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS LECTINAS DE SEMILLA Y DE RAIZ DE HABA (Vicia Faba)”

Yolanda de Navarro y Gerardo Pérez G.
Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química,
Universidad Nacional. Bogotá.

Keywords: Vicia faba, lectin, bactoagglutination, erythroagglutination *Rhizobium*.

RESUMEN

Se aislaron las lectinas de semilla y de las paredes celulares de la raíz de haba. La lectina de raíz se purificó parcialmente por Sephadex G-25 obteniéndose resultados que sugieren la presencia de dos lectinas. El comportamiento en filtración por gel, diálisis, electroforesis inhibición por carbohidratos de la eritroaglutinación, acción aglutinante frente a la cepa B de *R. leguminosarum* cultivada en medio Bishop. capacidad aglutinante de cepas homólogas y heterólogas de las dos lectinas demostraron que ellas son diferentes. La lectina de raíz parece ser más específica, ya que solo aglutinó a *R. leguminosarum* y *R. spp.* (caupi), mientras que la Favina presentó actividad bactoaglutinante con cepas nodulantes como con no nodulantes de diferentes especies de *Rhizobium*.

ABSTRACT

Lectins from seeds and cellular walls of roots from *Vicia faba* were isolated. The root lectin was partially purified by gel filtration on Sephadex G-25. The behavior of the two lectins regarding gel filtration, dialysis, gel electrophoresis, inhibition by carbohydrates, bactoagglutination of *R. leguminosarum* (Strain β) grown in Bishop medium, and bactoagglutination of homologous and heterologous *Rhizobia*, showed that the two lectins are different the root lectin appears to be more specific towards several nodulating and non-nodulating species of *Rhizobia*.

INTRODUCCION

Para explicar la especificidad en la interacción *Rhizobium*-leguminosa se han propuesto varias hipótesis; una de ellas ha postulado que las lectinas producidas por las leguminosas hospederas podrían servir como determinantes de la especificidad a través del enlazamiento de la lectina a estructuras de carbohidratos

característicos que se encuentran sobre la superficie celular del *Rhizobium* simbiote (1).

A pesar de la evidencia acumulada en favor de esta hipótesis (1-9) desde hace más de una década ha sido objeto de una gran controversia debido a los resultados reportados entre otros por Law Strijdom (10), Chen y Phillips (11), Su et al (12), Handelsman et al (13). Desafortunadamente en la mayoría de los trabajos se asume que las dos lectinas (de semilla y de raíz) son idénticas y se extrapolan al proceso de infección los resultados obtenidos con lectina de semilla. Además, si la lectina juega un papel importante en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es indispensable su presencia en las raíces, particularmente en los pelos radiculares, sitio inicial de unión del *Rhizobium* para la infección (14). Por otra parte, las lectinas de semillas han sido ampliamente estudiadas mientras que las lectinas presentes en las raíces de leguminosas han sido poco caracterizadas, debido posiblemente a que se encuentran en muy bajas concentraciones y su extracción no es un proceso simple (15). Estos hechos nos condujeron a realizar un trabajo con el fin de comparar algunas propiedades de las lectinas aisladas de semilla y de raíz de haba (*Vicia faba*) para establecer la identidad o no de los dos tipos de lectinas y determinar sus interacciones frente a cepas homólogas y heterólogas de *Rhizobium*.

MATERIALES Y METODOS

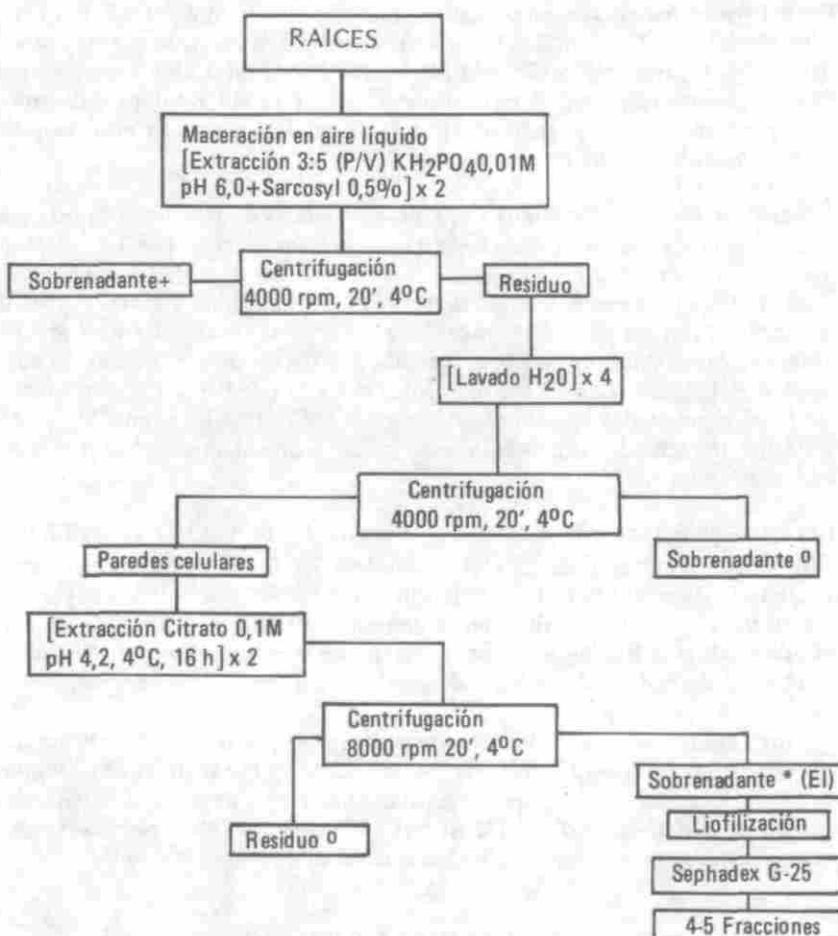
Aislamiento y Purificación Parcial de Lectinas. La Favina se extrajo de semillas de haba (*Vicia faba*) var Teusacá de acuerdo al método descrito por Asensio (16). Se purificó por cromatografía de afinidad a través de una columna de sephacryl S-200 (40x2 cm) equilibrada con NaCl 1%. Después de la elución de un primer pico se utilizó glucosa al 5% como eluyente.

A partir de las paredes celulares de raíces de haba, con 7 semanas de germinación, preparadas de acuerdo al método de Kauss (17, 18) se extrajo la lectina de raíz de haba (LRH) con algunas modificaciones en cuanto a la solución utilizada en la maceración, KH_2PO_4 0.01 M pH 6.0 y las condiciones de centrifugación. Los pasos seguidos se presentan en el Esquema 1. Como extractante se utilizó citrato de sodio 0.1 M pH 4.2. La lectina se fraccionó en una columna de Sephadex G-25 (80 x 2 cm) empleando H_2O desmineralizada como eluyente.

Ensayos de Aglutinación e Inhibición: Para determinar la capacidad de eritroaglutinación y la inhibición por azúcares se siguió la metodología descrita en (19), empleando una suspensión de eritrocitos humanos al 4% de los tipos A^+ , B^+ y O^+ . Para los ensayos con LRH se utilizó una solución ajustada a pH 5.5 con HCL 0.1N y a pH 7.0 con NaOH 0.1N y soluciones de azúcares 0.05 M y 0.3 M preparadas en NaCl 1%.

Diálisis: Un extracto de LRH liofilizado se disolvió en 3 mL de H_2O desm, se determinó su $\text{A}_{250}^{1\text{cm}}$ y $\text{A}_{280}^{1\text{cm}}$. Se reservaron 0.2 mL para efectuar pruebas de eritroaglutinación. El resto se dializó usando una membrana capaz de retener sus-

Esquema 1. ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE LECTINA DE RAIZ DE *Vicia faba*



- * Actividad hemoaglutinante
- o No presenta actividad hemoaglutinante
- + Presenta hemólisis.

tancias con un PM superior a 10 KDa, por tres veces consecutivas contra 50 mL de H₂O desm.; realizando cambios cada 6 horas. Los tres difusatos se reunieron y liofilizaron al igual que el retentato. Los dos liofilizados finales se redisolvieron en 3 mL de H₂O (vol original) y se determinó su A₂₃₀^{1 cm} y A₂₈₀^{1 cm}. Con alícuotas de 0.2 mL del retentato, del difusato, de una mezcla de los dos y del extracto original se hicieron ensayos de eritroaglutinación. El difusato liofilizado se pasó por una columna de Sephadex G-25 (80x2 cm).

Electroforesis: Se utilizaron geles en poliacrilamida de concentración T₂ C₅ y T₃ C₅ preparados en un buffer Tris-HCl 64 mM pH 6.7 y geles de separación T₇ C₅ y T₁₀ C₅ preparados en un buffer Tris-HCl 0,495 mM pH 8.9. El buffer de los tanques fue Tris 5 mM Glicina 41 mM pH 8.3 y en algunos ensayos se usó Tris 41 mM, ácido bórico 70 mM pH 8.6. Se corrieron a 250 V por dos horas. Posteriormente se ensayó la electroforesis propuesta por Konning y Bloemendal (20) para péptidos utilizando un sistema de gel T₁₀ C_{0,3} con poro pequeño y polivinilpirrolidona (PVP) al 40% y al 20%.

Ensayos de Bactoaglutinación: Las especies y cepas de *Rhizobium* junto con su procedencia y principales características se presentan en la Tabla 1. Se prepararon soluciones en NaCl 1% de las siguientes lectinas liofilizadas y su concentración se determinó por el método de Lowry (21). La Favina y LRH se obtuvieron de acuerdo con los procedimientos descritos en este trabajo. La soya se purificó utilizando una columna de poliacrilamida alilgalactósido (resultados no publicados) y el balú de acuerdo con la técnica descrita por Pérez (22); las globulinas de frijol precipitadas con sulfato de amonio 50% de saturación (23); la lectina de frijol de acuerdo al procedimiento descrito por Maldonado (24) y la arveja obtenida según (25).

Las cepas de *Rhizobium* se cultivaron durante 42, 66 y 138 h en medio BYMA (26) (manitol extracto de levadura) líquido a 28°C con agitación constante (60 osc/min.). Al finalizar cada uno de estos tiempos se determinó la A₅₅₀ nm de los cultivos. La bactoaglutinación se determinó utilizando 0.2 mL de las soluciones de lectinas ajustadas a pH 5.5 y 0.3 mL de las suspensiones de *Rhizobium* y se observó después de 2 y 4 horas de incubación a temperatura ambiente.

En otro ensayo se usaron únicamente suspensiones de la cepa B de *R* leg cultivadas en medio Bishop (27) durante 24, 40, 72 y 89 horas en iguales condiciones a las mencionadas. Las suspensiones bacteriales en este ensayo se lavaron con buffer de fosfato de sodio 0,1M en NaCl 1% pH 7.0 (PBS) por dos veces y se resuspendieron en el mismo buffer hasta obtener una A_{550nm} de 0.6.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento y purificación parcial de lectinas de semilla y de raíz: La Favina fue eluida con glucosa 5% de la columna de Sephacryl S-200 en un único pico (F_{II}) según lo descrito por Asensio (16).

TABLA 1
 PROCEDENCIA Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE RHIZOBIUM

Cepa Número	Hospedero	Fuente (*)	País de origen	Evaluación	Referencia
CIAT 17	<i>Pisum sativum</i>	SU 391	U.S.A.	Muy efectiva <i>Pisum spp</i> y <i>Vicia sativa</i>	CIAT
CIAT 18	<i>Lathyrus odoratus</i>	MARS18	Rhodesia	Muy efectiva <i>Pisum sativum</i>	CIAT
CIAT 65	<i>Trifolium repens</i>	PDD2153	Nueva Zelancia	Efectiva <i>Trifolium repens</i>	CIAT
CIAT 562	<i>Desmodium pabulare</i>	SMS11	Brasil	Efectiva <i>Arachis hipogea</i> y <i>Galactia striata</i>	CIAT
Niftal 1.397	<i>Vicia faba</i>	NIT-175-F2	U.S.A.	Efectiva <i>Vicia faba</i>	Niftal (***)
Niftal 1.400	<i>Vicia faba</i>	NIT-175-F1	U.S.A.	Efectiva <i>Vicia faba</i>	Niftal (***)
R. phaseoli	<i>Phaseolus spp.</i>	FRIJOL-1	Colombia	---	Lozano de Y 1980 (*****)
R. leguminosarum ELI	<i>Pisum sativum</i>	ELI	Colombia	Muy efectiva <i>Pisum sativum</i>	Luque 1978
R. leguminosarum A (**)	<i>Vicia faba</i>	YN□	Colombia	Muy efectiva <i>Vicia faba</i>	Navarro 1977 (**)
R. Leguminosarum B (**)	<i>Vicia faba</i>	YN B	Colombia	Muy efectiva <i>Vicia faba</i>	Navarro 1977 (**)

(*) Indica el número original de la cepa en el laboratorio que la recolectó.

(**) Aisladas y evaluadas durante el desarrollo de este trabajo.

(***) Niftal y Proyect. P.O. Box P. Patia, Hawaii 967 99.

(****) Departamento de Química. Sección Química Aplicada U.N. de Colombia.

Los ensayos iniciales de purificación de **LRH** por cromatografía de afinidad y filtración por gel con Sephadex G-50, G-100 y S-200 no arrojaron ningún resultado. El único soporte que permitió un buen fraccionamiento fue el Sephadex G-25.

El perfil cromatográfico del extracto de **LRH** (Gráfica 1-A) mostró una mejor resolución de sus componentes a 280 nm que a 230 nm. Se obtuvieron 5 fracciones de las cuales únicamente EI-3 y EI-4 presentaron actividad eritroaglutinante fuerte (+3) y pardeamiento en la pigmentación de los eritrocitos.

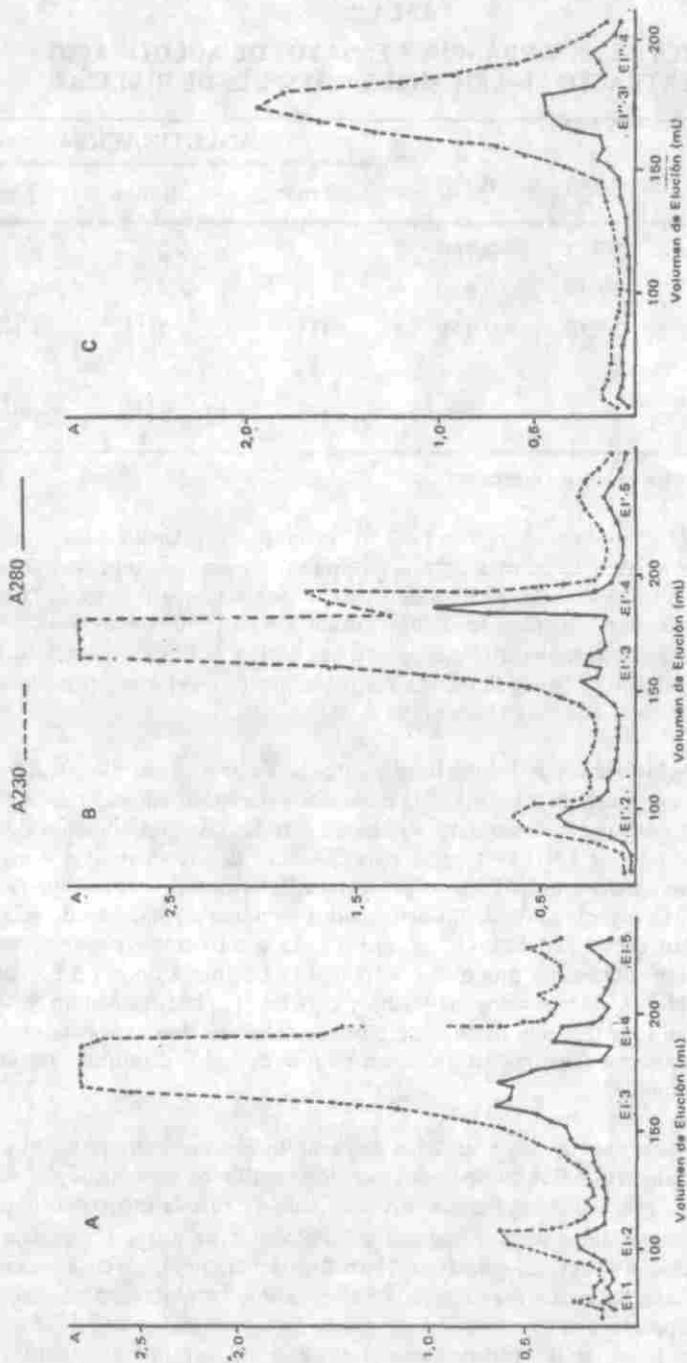
Pérez (comunicación personal) encontró que el buffer de citrato de sodio 0.1M pH 6.0 pasado a través de la misma columna de Sephadex G-25 presentó un pico considerable a 230 nm con un volumen de elución que concuerda con el pico donde eluye la lectina. En consecuencia, se eliminó el citrato del extracto EI por ultrafiltración en una celda de amicón utilizando una membrana UM 05. En la Gráfica 1B se presenta el perfil cromatográfico de **LRH** obtenido en el cual se observaron 4 fracciones designadas EI'-2, EI'-3, EI'-4 y EI'-5 por analogía con lo obtenido en la Gráfica 1A que se utiliza como patrón de comparación. La eliminación de citrato no provocó una disminución en la absorbancia a 230 nm, como era de esperarse si EI-3 fuera predominantemente citrato por lo tanto, el material correspondiente a esta fracción debe estar constituido básicamente por péptidos. Únicamente las fracciones EI'-3 y EI'-4 presentaron actividad eritroaglutinante similar (+3) eliminándose casi por completo el pardeamiento de los eritrocitos. Estos resultados indicaron que la capacidad aglutinante de **LRH** no es afectada por valores bajos de pH, mientras que la coloración de los eritrocitos aglutinados depende del pH del extracto ensayado.

Las fracciones activas al dializarlas perdían por completo su actividad eritroaglutinante mientras que la Favina la conservó. Si tenemos en cuenta que el soporte utilizado (Sephadex G-25) separa en un rango de PM de 1000 a 5000 daltons (28) y la membrana de diálisis permite el paso de moléculas con un PM inferior a 10 KDa, las fracciones de **LRH** deben ser polipéptidos de PM comprendido entre 1000 y 5000.

Cuando la fracción **EI-LRH** liofilizada y redisuelta en 3 mL de H₂O desm se sometió a diálisis, de acuerdo con el procedimiento descrito en la parte experimental, y a pruebas de aglutinación, se observó (Tabla 2) una pérdida de absorbancia a 280 nm en forma similar a lo observado en diálisis de lectinas de raíz de arveja (25) y frijol (24).

En las pruebas de aglutinación se apreció claramente como el retentato de **EI-LRH** perdió toda actividad eritroaglutinante mientras que su difusato presentó actividad aglutinante similar a la del extracto inicial. Cuando se mezclaron el retentato y el difusato su actividad aglutinante fue similar a la del difusato, lo cual indicó que los componentes con PM mayores de 10 KDa, retenidos en la membrana de diálisis, no son necesarios para la actividad aglutinante de la lectina.

Gráfica No 1 Filtración por Gel del Extracto EILRH



- A. Extracto EILRH. Condiciones: Sephadex G-25 (80 x 2 cm) H₂O desmineralizada.
- B. Extracto EILRH. Ultrafiltrado por UM 05. Condiciones iguales a A.
- C. Difusato del Extracto EILRH. Condiciones iguales a A.

TABLA 2
VALORES DE ABSORBANCIA Y ENSAYOS DE AGLUTINACION
DEL EXTRACTO EI-LRH ANTES Y DESPUES DE DIALIZAR

Extracto	A230	A280	AGLUTINACION		
			20 min.	30 min.	1 hora
El inicial	2,757	2,760	+ 2	+ 2	+ 3
El retentato	1,679	0,850	-	-	-
El difusato	2,778	2,778	+ 1(1)	+ 2(1)	+ 1(1)
Retentato + difusato			+ 1	+ 1(i)	+ 2(1)

(1) Indica pardeamiento de los eritrocitos.

El conjunto de resultados obtenidos para filtración por gel (Gráfica 1A, B, C) indicó la posible existencia de más de una lectina en las paredes celulares de raíz de haba. Una situación análoga ha sido descrita por Kauss y Bowles (17) para *P. aureus*, por Bawer (29) para soya, por Luque y Kijne (30) para arveja. Estos resultados revelaron notables diferencias entre la LRH y la Favina en cuanto a su forma de extracción, comportamiento en filtración por gel y peso molecular que para el caso de la Favina (31) es de 51 KDa.

Ensayos de Aglutinación e Inhibición: Tanto la Favina como el extracto de LRH aglutinaron fuertemente (+ 3, + 4) eritrocitos humanos sin mostrar especificidad por un grupo sanguíneo determinado. En todas las aglutinaciones donde se utilizó el extracto de LRH se apreció pardeamiento de los eritrocitos. Cuando este extracto se ajustó a un pH 5,5 no se alteró la actividad aglutinante de la lectina pero sí varió la coloración de los aglutinados de parda a roja; cuando se ajustó a un pH neutro con NaOH 0.1N se perdió toda la actividad eritroaglutinante de la lectina demostrándose que dicha actividad es óptima a un pH 5.5 y desaparece a un pH 7.0. A este respecto Kauss y Bowles (17) obtuvieron un resultado diferente para las lectinas aisladas de paredes celulares de *P. aureus* donde la capacidad enlazante es óptima en un rango neutro de pH y disminuye hacia valores ácidos de pH.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la inhibición por carbohidratos de la eritroaglutinación con LRH comparados con los resultados obtenidos por Asensio (16) para la inhibición de Favina. En la lectina de raíz la eritroaglutinación fue inhibida completamente por manosa y 2 deoxiglucosa a una concentración 0.3M mientras que fructosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, glucosa, manitol, celobiosa, lactosa, sacarosa, melezitosa, y rafinosa solo la inhibieron parcialmente porque se apreció una disminución del grado de aglutinación (3a+ 1). Los dos azúcares inhibidores de la aglutinación presentaron en común las siguientes ca-

TABLA 3
INHIBICION POR CARBOHIDRATOS DE LA ERITROAGLUTINACION

CARBOHIDRATOS	AGLUTINACION ⁽¹⁾		
	Favina ⁽²⁾	LRH	
	0,1M*	0,05M*	0,3M*
D- Arabinosa	+ 4	+ 2	+ 2
D- Xilosa	+ 4	+ 3	+ 2
D- Fructosa	-	+ 3	+ 1
D+ Galactosa	+ 4	+ 3	+ 1
D- Galactosamina	ND (3)	+ 3	+ 3
N- Acetil α -D-galactosamina	ND	+ 3	+ 1
Galacturónico	ND	+ 3	+ 2
D+ Glucosa	+ 3 (4)	+ 3	+ 1
D- Glucosamina	+ 3	+ 3	+ 3
N- Acetil α -D-Glucosamina	-	+ 3	+ 2
D- Manosa	+ 2 (5)	+ 3	-
D- Manitol	+ 3	+ 3	+ 1
L- Sorbosa	+ 2 (6)	+ 3	+ 2
D+ Celobiosa (glc β 1-4 glc)	ND	+ 3	+ 1
D- Fucosa	ND	+ 3	+ 2
D+ Melibiosa (Gal α 1-6 glc)	ND	+ 3	+ 2
D+ Lactosa (Gal β 1-glc)	+ 4	+ 3	+ 1
D+ Sacarosa (glc 1-2 Frc)	-	+ 3	+ 1
D \ddagger Maltosa	-	ND	ND
D+ Melezitosa (glc α 1-2 β Frc 3-1 α glu)	ND	+ 3	+ 1
D+ Rafinosa (gal α 1-6 Glc α 1-2 Frc)	ND	+ 3	+ 1
Sorbitol	+ 4	ND	+ 2
2 Deoxiglucosa	ND	ND	-
Acido siálico	ND	ND	+ 2
Trehalosa	ND	ND	+ 2

(1) Aglutinación observada a las 4 horas de incubación.

(2) Resultados obtenidos por Asensio (16)

(3) No determinado.

(4) Inhibe la eritroaglutinación a concentraciones superiores a 0,3M (16).

(5) Inhibe la eritroaglutinación a concentraciones superiores a 0,2M (16).

(6) Inhibe la eritroaglutinación a concentraciones superiores a 0,1M (16).

* Indica la concentración inicial de los carbohidratos usados en cada ensayo.

racterísticas: Son aldohexosas, con los hidroxilos 1', 3', 4' y 6' libres y los hidroxilos 3' y 4' están en posición trans; aparentemente el hidroxilo del carbono 2 no intervendría en la inhibición. Si se compara el efecto de la hexosa (manosa) con su correspondiente alcohol (manitol) se observa una disminución del poder inhibitor cuando el grupo carbonilo es reemplazado por un alcohol. Este reemplazo impide que la molécula esté en forma cíclica, lo que sugiere que en la reacción es importante la presencia de una estructura cíclica.

El hecho que la glucosa, los disacáridos celobiosa y lactosa y los trisacáridos, rafinosa y melezitosa donde participa la glucosa presentaron una acción inhibitoria parcial, indicaría que la presencia del hidroxilo 2' en posición trans respecto a 3' disminuye la capacidad inhibitoria de estos azúcares. Se observó que la glucosamina y la N-acetilglucosamina donde este hidroxilo ha sido reemplazado por un grupo amino o acetilamino tampoco exhiben acción inhibitoria.

No hay una explicación satisfactoria para el posible efecto sobre la inhibición de los enlaces β 1, 4 comunes a la celobiosa y lactosa o de la unión glucosa α 1, 2 β Fructosa común a la rafinosa y melezitosa. Aparentemente no se necesitarían los carbonos 1 y 4 libres. En cuanto a la galactosa y la N-acetilgalactosamina (inhibidores parciales) presentan los hidroxilos de los carbonos 3 y 4 en posición cis lo que conllevaría a una disminución del poder inhibitorio. Del análisis anterior se puede concluir que para la unión de LRH con el azúcar es indispensable una aldehexosa, con los hidroxilos 3' y 4' en posición trans. Al comparar los perfiles de inhibición por carbohidratos de la eritroaglutinación debidas a las lectinas de raíz y semilla se observó que la manosa es un inhibidor común a concentración de 0.3M para LRH y a concentraciones mayores de 0.2M para Favina y la glucosa es un inhibidor parcial de ambas lectinas a concentración de 0.3M de acuerdo con los resultados de Asensio (16), pero según otros autores (32) la manosa 25 mM causa un 50% de inhibición y posee un actividad inhibitoria 4 veces mayor comparada con la glucosa. La Fructosa y sacarosa que son inhibidores de la Favina a concentración 0.1M, exhiben acción inhibitoria parcial de la LRH a concentraciones de 0.3M. Estos resultados disímiles en los perfiles de inhibición de eritroaglutinación establecieron que la interacción de las dos lectinas con la membrana del eritrocito se realiza a través de un receptor diferente. El grupo de Gatehouse y Boulter (33) encontraron que las lectinas de raíz y de semilla de arveja son similares por análisis electroforético e inmunodifusión radial pero difieren en la especificidad por el azúcar en los ensayos de eritroaglutinación; en forma similar a nuestros resultados.

Electroforesis: En la electroforesis de la Favina se obtuvieron dos bandas cercanas entre sí y en algunos casos una tercera banda con mayor movilidad electroforética cuya aparición depende de la concentración de la lectina ensayada. En la electroforesis de LRH no fue posible detectar bandas en ningún caso a pesar de las diversas condiciones experimentales utilizadas. Muy probablemente la lectina por ser un péptido de bajo peso molecular difundió del gel antes del proceso de fijación y coloración. Luque (27) obtuvo idénticos resultados para la lectina de raíz de arveja.

Ensayos de Bactoaglutinación: Los resultados de los ensayos de bactoaglutinación de diferentes cepas de *Rhizobium* por LRH y Favina se presentan en la Tabla 4; se observó que las cepas A, B y C17 de *R. leguminosarum* son capaces de interactuar con las lectinas indistintamente de si provienen de raíz o de semilla. La acción bactoaglutinante de los dos tipos de lectinas frente a las cepas es independiente de la fase de crecimiento (media logarítmica 42 h, estacionaria

TABLA 4
VALORES DE ABSORBANCIA Y ENSAYOS DE AGLUTINACION
DEL EXTRACTO ANTES Y DESPUES DE DIALIZAR

Cepa/edad del cultivo h	ABSORBANCIA			AGLUTINACION ⁽¹⁾					
	550 nm			Favina			LRH		
	42	66	138	42	66	138	42	66	138
<i>R. leguminosarum</i> A	0,310	0,602	0,658	+2 ⁽²⁾	+2	+2	+2	+2	+2
<i>R. leguminosarum</i> B.	0,347	0,699	0,745	+2	+2	+2	+2	+2	+2
<i>R. leguminosarum</i> C18	0,000	0,118	0,252	—	—	+1	—	—	—
<i>R1 leguminosarum</i> Nifal 1400	0,009	0,009	0,201	—	—	—	—	—	—
<i>R. leguminosarum</i> ELI	0,194	0,319	0,877	+1 ⁽³⁾	+1	—	—	—	—
<i>R. leguminosarum</i> Nifal 1397	0,009	0,009	0,155	—	—	+1	—	—	—
<i>R. leguminosarum</i> C17	0,208	0,301	0,602	+1	+1	+2	+1	+1	+1
<i>R. phaseoli</i>	0,114	0,301	0,319	+1	+1	—	—	—	—
<i>R. trifolii</i> C65	0,131	0,222	0,367	+1	+1	—	—	—	—
<i>R. spp</i> C562 (Caupi)	0,268	0,398	0,409	+1	+1	—	—	—	—

(1) Tiempo de observación de aglutinación: 4 horas

(2) Bacto

(1) Tiempo de observación de aglutinación: 4 horas

(2) Bactoaglutinación mediana

(3) Bactoaglutinación débil.

66 h, y estacionaria tardía 138 h.) en que se encuentren los *Rhizobium* cultivados en medio BYMA. En consecuencia los sitios receptores estarían presentes en la bacteria durante todo el tiempo de cultivo. Este resultado está en desacuerdo con lo observado por Bhuvanewari et al (3) quienes encontraron un alto porcentaje de células bacteriales enlazantes de la lectina de soya cuando se encontraban en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento, notándose una disminución considerable cuando los cultivos entraban a la fase estacionaria. Dazzo et al (9) también encontraron que la capacidad de *R. trifolii* para unirse a los pelos radiculares de trébol y ser aglutinados por Trifolina A, variaban con la edad del cultivo presentándose un enlazamiento óptimo a los 5 días (fase estacionaria).

La Favina se unió con la mayoría de las cepas ensayadas; este comportamiento es muy similar al de la lectina aislada de *Canavalia ensiformes* (Con A) como lo demuestran los estudios realizados por Dazzo y Hubbell (34). Mientras que la LRH se unió únicamente a las cepas A, B y C17 de *R. leguminosarum*, aparentemente por ser más específica en la interacción que la Favina.

De otra parte cabe destacar que los cultivos de *R. leg* EL1, *R. phaseoli*, *R. trifolii* y *R. spp* (caupi) que perdían su capacidad de enlazamiento de la lectina cuando llegaron a la fase estacionaria tardía; mostraban nuevamente dicha capacidad en fase logarítmica o en fase estacionaria temprana.

En la Tabla 5 se presentan los resultados de los ensayos de aglutinación de las cepas de *Rhizobium* crecidas en BYMA por diferentes lectinas de semillas comparados con la LRH. Las diferentes lectinas ensayadas tenían una concentración

TABLA 5

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD BACTOAGLUTINANTE DE LA LRH Y LECTINAS DE SEMILLAS FRENTE A DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium* (fase log tardía, 48 horas)

Especies y cepas de <i>Rhizobium</i>	A550 nm	AGLUTINACION						
		Favina	LRH	L. arveja	Globulinas trífol	L. trébol	L. soya	L. balú
Conc. Prot. µg/ml		220	370	270	350	210	240	230
<i>R. leg</i> cepa A	0,301	+2(1)	+2	+1(2)	—	+1	+1	+1
<i>R. leg</i> cepa B	0,276	+2	+1	+1	—	+1	+1	+1
<i>R. leg</i> C18	0,292	+1	—	+1	+1	+1	—	—
<i>R. leg</i> C17	0,347	+1	+1	+1	+2	+1	—	+1
<i>R. leg</i> EL1	0,174	+1	—	+1	—	+1	+1	+1
<i>R. leg</i> Niftal 1400	0,287	—	—	—	—	+1	—	+1
<i>R. leg</i> Niftal 1397	0,337	+1	—	—	+1	+1	—	—
<i>R. phaseoli</i>	0,168	+1	—	—	—	+1	—	+1
<i>R. trifolii</i> C65	0,398	+1	—	—	+1	+1	—	+1
<i>R. spp</i> C562 (caupi)	0,155	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+3(3)

(1) Bactoaglutinación mediana

(2) Bactoaglutinación débil

(3) Bactoaglutinación fuerte

que variaba entre 210 y 370 µg/mL. El tiempo de 48 horas corresponde a la fase de crecimiento logarítmica tardía.

Las 10 cepas de *Rhizobium* utilizadas en este ensayo, están clasificadas como *Rhizobium* de crecimiento rápido, con excepción de C562 *R. spp*, del grupo caupi, que es de crecimiento lento. Considerando los valores de absorbancia a 550 nm como criterio del contenido de bacterias y de la producción de polisacáridos, se observa que la mayoría de los cultivos de *Rhizobium* presentan valores similares de A550nm.

La baja A550 nm que mostraron las cepas EL1 de *R. leg* y *R. phaseoli*, posiblemente se deba a poca producción de polisacáridos en ellas. La Favina presentó acción similar frente a algunas de las cepas de *Rhizobium* ensayadas como son A, B, C17 y EL1 de *R. leg*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, y *R. spp* (caupi). Esta lectina mostró actividad *Rhizobium* aglutinante tanto con cepas simbióticas como con cepas fuera de su grupo de inoculación cruzada. La lectina de balú reaccionó con todas las cepas heterólogas ensayadas salvo C17 y Niftal 1.397 de *R. leg*. La lectina de arveja aglutinó todas las cepas de *R. leg* exceptuando las cepas Niftal 1.400 y 1.397. No presentó actividad *Rhizobium* aglutinante con *R. phaseoli* y *R. trifolii* que no pertenecen a su grupo de inoculación cruzada mostrando aparentemente más especificidad en la aglutinación que la Favina y el balú. La lectina de soya aglutinó 3 cepas de *R. leg*, pero no mostró acción frente a *R. phaseoli* y *R. trifolii*.

La LRH aparentemente mostró mayor especificidad en la aglutinación. Única-

mente aglutinó 3 cepas de *R. leg* siendo más fuerte la aglutinación frente a la cepa A, confirmando los resultados anteriores.

Cabe destacar la acción aglutinante que presentaron las diferentes lectinas frente a *R. spp* del grupo caupi; ya que esta cepa es aglutinada por todas las lectinas. Por otra parte, el extracto de globulinas fríjol presentó menor capacidad *Rhizobium* aglutinante que la lectina de fríjol, la cual corresponde a una fracción de albúmina parcialmente purificada (24).

En general, las lectinas que presentaron mayor especificidad, en el efecto *Rhizobium* aglutinante fueron las aisladas de semilla de arveja y la LRH, exceptuando la actividad frente a *R. spp* (caupi); mientras que las lectinas de semilla de haba (Favina), fríjol, soya y balú tendrían un comportamiento similar al encontrado por Dazzo y Hubbell (34) para la Con A.

A pesar de que las leguminosas haba y arveja pertenecen a un mismo sistema simbiótico y sus lectinas reconocen iguales azúcares (glu, fru, man) en eritroaglutinación (31); sus respectivas lectinas mostraron diferente especificidad en el enlazamiento de las distintas cepas de *Rhizobium* ensayadas. Estos resultados sugieren tal como lo anota Wong (31) que el enlazamiento de la lectina al *Rhizobium* es determinado no solamente por la especificidad de la lectina frente a un carbohidrato dado sino también por características de tipo estructural como número de subunidades o sitios de enlazamiento del azúcar a las lectinas.

Por otra parte, la LRH que siempre tuvo efecto aglutinante sobre la cepa de β *R. leg*, cuando la cepa se cultivaba en medio BYMA (Tablas 4 y 5) este efecto lo pierde cuando la cepa es cultivada en medio Bishop. (Tabla 6) demostrando de manera bastante clara que los sitios receptores en la bacteria encargada del enlazamiento se modificaron dependiendo del medio. Idéntico resultado se observó para la lectina de balú. La Favina sólo presentó la actividad *Rhizobium* aglutinante en la fase estacionaria con bacterias cultivadas en medio Bishop a diferencia del comportamiento observado en el medio BYMA; al igual que las lectinas de arveja, soya y fríjol. Se hizo evidente la enorme diferencia en la acción *Rhizobium* aglutinante de los dos tipos de lectinas.

Los ensayos comparativos entre las lectinas aisladas de raíz y de semilla en cuanto a forma de extracción, comportamiento en filtración por gel, diálisis, electroforesis, inhibición por carbohidratos de la eritroaglutinación, acción aglutinante frente a *R. leg* (cepa β cultivada en medio Bishop), capacidad aglutinante de cepas homólogas y heterólogas y en el enlazamiento de *Rhizobium* con lectinas marcadas con FITC (manuscrito en preparación) demostraron que se trata de dos lectinas diferentes. Una situación análoga ha sido observada previamente en nuestro grupo de investigación para el caso de arveja (25) y a lo reportado por Quinn et al (14) para *Dolichos biflorus*. En otros casos se reporta similitud para las dos lectinas como en soya (35), arveja (30,33) y trébol (5).

TABLA 6
ENSAYOS DE AGLUTINACION POR DIFERENTES LECTINAS
DE LA CEPA B DE *Rhizobium leguminosarum* CULTIVADA
EN MEDIO BISHOP

Lectinas	Edad del cultivo (horas)			
	24	40	72	89
Favina	—	—	+1 ⁽¹⁾	+1
Lectina de raíz de haba	—	—	—	—
Lectina de arveja	—	—	+1	+2 ⁽²⁾
Lectina de soya	—	—	+2	+2
Lectina de balú	—	—	—	—
Globulinas de frijol	+1	+1	+1	+2
Lectina de frijol	+2	+1	+2	+2

(1) Bactoaglutinación débil

(2) Bactoaglutinación mediana.

AGRADECIMIENTOS

Manifestamos nuestros agradecimientos a la Organización de Estados Americanos y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero. Al Instituto de Biotecnología de la U. Nacional por su amable colaboración.

BIBLIOGRAFIA

1. DAZZO F.B., HUBBELL D.H., *App Microbiol.* 1975. 30 1017.
2. HAMBLIN J., KENT, S.P., *Nature New Biol.*, 1973 245, 28.
3. BHUVANESWARI, T.V., PUEPPKE S.G., BAYER, W.D., *Plant Physiol.* 1977. 60, 486.
4. DAZZO F.B., HUBBELL D.H., *App. Microbiol.* 1975. 30, 172.
5. DAZZO F.B., YANKEE W.E., BRILL W.J., *Biochem. Biophys. Acta*, 1978. 539, 276.
6. PLANQUE, K., KIJNE J.W., *FEBS Letters*, 1977. 73, 64.
7. TSIEN, H.C., SCHMIDT, E.L., *Can J. Microbiol.* 1977. 23, 1274.
8. CALVERT, H.E., LALONDE M., BHUVANESWARI T.V., BAUER W.D., *Can J. Microbiol.* 1978, 24, 785.
9. DAZZO, F.B. URBANO M.R., BRILL, W.J., *Current Microbiol.* 1979, 2, 15.
10. LAW I.J., STRIJDOM, B.W., *Soil Biol. Biochem.* 1977. 9, 79.

11. CHEN, A.P.T., PHILLIPS, D.A., *Physiol. Plant.*, 1976, **38**, 83.
12. SU L.C., PUEPKKE S.G., FRIEDMAN, H.P., *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, **629**, 292.
13. HANDELSMAN J., UGALDE, R.A., BRILL W.J., *J. Bacteriol.*, 1984, **157**, 703.
14. QUINN, J.M., ETZLER M.E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, **258**, 535.
15. BUFFARD, D., KAMINSKI, P.A., STROSBERG, D., *Planta* 1988, **173**, 367.
16. ASENSIO, N.E. "Purificación y caracterización de la hemoaglutinación del haba (*Vicia faba*)" Tesis Químico. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá 1975.
17. KAUSS H., BOWLES D.J., *Planta (Berl)*; 1976, **130**, 169.
18. KAUSS, H. GLASER, C., *FEBS Letters.*, 1974, **45**, 304.
19. NAVARRO, Y., PEREZ, G. *Rev. Col. Quím.*, 1978, **8**, 25.
20. KONNINGS, R.N.H., BLOEMENDAL, H., *Eur. J. Biochem.* 1979, **7**, 165.
21. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR, A.L. RANDALL, R.J. *J. Biol. Chem.*; 1951, **193**, 265.
22. PEREZ, G. "Purificación de la lectina de *Erythrina Edulis*". XII Congreso Latinoamericano de Química. Quito, Ecuador, Sept, 1976.
23. DE AZEVEDO, R., CONSANI J. *Plant Physiol.*, 1977, **59**, 783.
24. MALDONADO C.E., "Estudio comparativo de lectinas presentes en semillas y raíces de algunas leguminosas". Tesis, Químico, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 1982.
25. LUQUE E., "Estudio de la eventual interacción *Rhizobium-Lectina de Pisum Sativa*". Tesis Magister en Ciencias. Departamento de Química Universidad Nacional de Colombia. Bogotá 1981.
26. VINCENT, J.M., "Manual práctico de Rhizobiología. 1a. Ed. Hemisferio sur, Buenos Aires, 1975.
27. BISHOP, P.E., GUEVARA, J.G., ENGELKE, J.A., EVANS, H.J., *Plant Physiol.*, 1976 **57**, 542.
28. Pharmacia fine chemicals. "Separation media, Equipment and Instrumentation for chromatography, electrophoresis and cell Studies". Catalogue, pag. 11, 1979.
29. BAUER, W.D. "Role of Soybean lectin in the soybean-*Rhizobium Japonicum* Symbiosis". Nitrogen Fixation VII, ed Newton W.E. and Orme Jhonson W.H. University Park Press, Baltimore, p. 205, 1980.
30. KIJNE, J.W., VANDER, SCHAAL I.A.M., DE VRIES G.E. *Plant Sci. letts* 1980, **18**, 65.
31. WONG, P.P., *Plant., Physiol.*; 1980, **65**, 1049.
32. GOLDSTEIN I.J., HAYES C.E., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem* 1978, **35**, 127.

33. GATEHOUSE, J.A., BOUTLER, D. *Physiol. Plant* 1980, **49**, 437.
34. DAZZO, F.B., HUBBELL, D.H. *Plant soil*, 1975. **43**, 713.
35. GADE, W., JACK, M.A., DAHL, J.B., SCHMIDT, E.L., WOLD, F.J., *Biol. Chem.* 1981, **256**, 12905.