

COMPARACIÓN DE LAS LECTINAS EXTRAÍDAS DE LA SEMILLA Y LA RAÍZ DE ARVERJA (*Pisum sativum*)

J. Ernesto Luque T.*

Recibido septiembre 15/96 - Aceptado septiembre 20/97

Keywords: Lectins, *Rhizobium leguminosarum*, erythroagglutination, inhibition by carbohydrates

RESUMEN

Se aisló la lectina de la semilla de arverja (LSA) y se purificó por cromatografía de afinidad, a través de una columna de Sephadex G-100. La lectina de raíz (LRA) se aisló de las paredes celulares de la raíz de arverja. Entre los extractantes utilizados el que mostró mejores resultados fue el citrato de sodio 0.1 M, pH 4.2.

Las diferencias en el proceso de extracción, el distinto comportamiento en filtración por gel, diálisis, inhibición de la eritroaglutinación por carbohidratos, electroforesis en gel, la acción aglutinante frente a diversas cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, las divergencias en el peso molecular y en la solubilización parecen indicar que las lectinas extraídas de la semilla y de la raíz de arverja son moléculas diferentes.

Por otro lado, bacterias de *Escherichia coli* se unieron a las lectinas de semilla y de raíz lo cual sugiere que la unión lectina-*Rhizobium* no es específica.

ABSTRACT

Lectina from *Pisum sativum* seed was isolated and then it was purified

by affinity chromatography on a Sephadex G-100 column. Lectin of root was isolated from cellular walls. Sodium citrate 0.1 M, pH 4.2 was the best extractant.

The extraction process differences, gel filtration behavior of the two lectins, dialysis, inhibition by carbohydrates of the erythroagglutination, gel electrophoresis, agglutination with *Rhizobium leguminosarum* strains and differences in molecular weight and solubilization showed that probably the two lectin molecules are different.

Lectin-rizobial binding is not specific, because both of the lectins were associated with *Escherichia coli* too.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los sistemas biológicos para fijar el nitrógeno, quizás el más promisorio, desde el punto de vista agronómico, lo constituye la asociación simbiótica entre las bacterias del género *Rhizobium* y las raíces de las leguminosas.

La asociación *Rhizobium*-leguminosa reviste un carácter específico: una cepa determinada de la bacteria sólo puede infectar ciertas especies o variedades de leguminosa. Es posible que la lectina producida por la planta juegue algún papel en el enlazamiento de la bacteria, con posterioridad a los eventos de reconocimiento entre planta y bacteria (1,2). Un hecho que apoya esta posibilidad es que las lectinas se localizan en la región de la raíz que es más susceptible a la infección por *Rhizobium* (3).

*Departamento de Química, Universidad de Nariño. Pasto, Nariño, Colombia.

Las lectinas son proteínas o gluco-proteínas, diferentes a los anticuerpos, capaces de interactuar específica y reversiblemente con la parte azúcar de (complejos) glucoconjugados (4). En general, no se conoce la función fisiológica de las lectinas de las plantas (5, 6). Puede ser que las lectinas jueguen un papel en el enlazamiento de factores Nod (7). Existe la posibilidad de clarificar esta hipótesis mediante la disponibilidad de factores Nod marcados (8). De todas formas, el papel bioquímico de las lectinas y los eventos simbióticos en los cuales participan siguen sujetos a debate. Con el interés de contribuir al esclarecimiento de dicho papel, en este trabajo se busca establecer similitudes y diferencias entre las lectinas aisladas de la semilla y la raíz de arveja (*Pisum sativum*) y determinar si estas lectinas interactúan específicamente con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y purificación de la lectina de la semilla de arveja (LSA).

LSA se extrajo de polvo de semillas de arveja, var. Guatecana, siguiendo el procedimiento de Entlicher y colaboradores (9), con modificaciones en cuanto al solvente utilizado para la suspensión del polvo de arveja (cloruro de sodio al 1 por ciento, en reemplazo del agua destilada), la columna utilizada para la purificación (indistintamente Sephadex G-100 o Sephacryl S-200) y el desorbente utilizado (glucosa 0.1 M, en lugar de ácido clorhídrico).

Extracción de la lectina de la raíz de arveja (LRA).

Las plantas de arveja se cultivaron sobre musgo, en períodos comprendidos entre 9 y 40 días, al cabo de los cuales se separaron las raíces y se lavaron con agua destilada.

Para la preparación de las paredes celulares y la posterior extracción de la lectina de raíz de arveja se siguió el procedimiento de Kauss y colaboradores (10, 11) pero el buffer de fosfato de potasio no contenía sacarosa.

Como extractantes primarios se utilizaron: (1) citrato de sodio 0.1 M, pH 4.2; (2) fosfato de potasio 0.5 M en mercaptoetanol al 0.2 por ciento, pH 7.0; (3) cloruro de sodio al 1 por ciento. Como extractante secundario, en todos los casos, se utilizó la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA-Na₂) 0.05 M. La lectina se fraccionó en una columna de Sephadex G-25, utilizando agua desmineralizada como eluyente.

Diálisis

Al extracto de LRA obtenido utilizando citrato como extractante, se le determinó su absorbancia a 230 nm y 280 nm. Con una alícuota de las fracciones que mostraron picos de absorción se realizaron ensayos de eritroaglutinación. El resto se dializó, usando una membrana capaz de retener sustancias con un peso molecular superior a 10 Kd, contra 250 mL de cloruro de sodio al 1 por ciento. Al retentato se le determinó la absorbancia a 280 nm.

Ensayos de aglutinación e inhibición.

Para determinar la capacidad de eritroaglutinación y la inhibición por azúcares se siguió la metodología descrita por Navarro y Pérez (12). Para las pruebas de eritroaglutinación se utilizaron LSA y LRA (sin dializar) y suspensiones de eritrocitos humanos al 4 por ciento, del tipo A+, B+ y O+. Para las pruebas de inhibición por azúcares sólo se utilizaron suspensiones de eritrocitos humanos del tipo A+. La concentración inicial de los azúcares utilizados fue de 10 mM pero después de agregar la solución de lectina su concentración se redujo a la mitad.

Electroforesis.

Se utilizaron muestras de LSA y LRA, disueltas en un buffer Tris 0.005 M-Glicina 0.041 M, pH 6.3, en una concentración de 10 µg/mL. Como gel de concentración se utilizó T₃C₅, preparado en un buffer Tris-HCl 61 mM, pH 6.7 y como geles de separación se utilizaron T₇C₅ y T₁₀C₅, preparados en un buffer Tris-HCl 0.49 M, pH 8.9. Se corrieron a 250 V y 40 mA, durante dos horas.

Determinación del peso molecular de LSA.

Se siguió la técnica descrita por Andrews (13). Se utilizó una columna de 69 x 1.1 cm y como soporte Biogel A 0.5 m, 100-200 mallas.

Para determinar el volumen muerto, se aplicaron 100 µL de una solución de Azul de dextrano (5 mg/mL). Se recogieron fracciones de 2.0 mL/tubo, con una velocidad de flujo de 10 mL/hora y se leyeron a 230 nm. Como proteínas de referencia se utilizaron albúmina bovina (Hopkins Williams), ovoalbúmina (Sigma) y Citocromo C de corazón de caballo (Sigma). Estas proteínas y LSA se disolvieron en cloruro de potasio 0.15 M (10 mg/mL). De la mezcla anterior se aplicaron 200 µL a la columna de Biogel equilibrada con cloruro de potasio 0.15 M. Se recogieron fracciones de 2.0 mL/tubo, con una velocidad de flujo de 10 mL/hora y se leyó su absorbancia a 230 nm. Las fracciones correspondientes a un pico de absorción se reunieron y se liofilizaron. Con el liofilizado de las fracciones correspondientes al pico de absorción, donde se presentó eritroaglutinación, se efectuó una electroforesis en gel de poliacrilamida. En el gel se colocaron también, como referencia, 25 µL de cada una de las proteínas (10 mg/mL) que se aplicaron a la columna de Biogel. Se utilizó un gel de concentración T₃C₅ y un gel de separación T₇C₅. Se dejó correr a 250 V, durante dos

horas. Las proteínas se fijaron con ácido tricloroacético al 10 por ciento y se tiñeron con azul de Coomassie.

Ensayos de bactoaglutinación.

Se prepararon soluciones de LSA y LRA en cloruro de sodio al 0.85 por ciento. Para obtener la lectina de raíz se utilizó citrato como extractante, en plantas de 9, 12 y 24 días de edad (LRA C9, LRA C12 y LRA C24, respectivamente). Se utilizaron tres cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y una de *Escherichia coli*. Se siguió una técnica de aglutinación indirecta propuesta por Hamblin y Kent (14).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y purificación de LSA.

Entlicher y sus colaboradores (9) utilizaron una columna de Sephadex G-150 y realizaron la desorción con un buffer de Glicina-HCl pH 2.0. Trowbridge (15), por su parte, utilizó una columna de Sephadex G-100 y liberó la lectina por elución con glucosa 0.2 M. En ambos casos, coincidiendo con nuestros resultados, la fracción obtenida por desorción de la columna presenta hemoaglutinación.

Aislamiento y purificación de LRA.

La eventual lectina presente en la raíz no se solubiliza en cloruro de sodio al 1 por ciento, utilizado como primer extractante. Los mejores resultados se obtuvieron con citrato 0.1 M, pH 4.2. El fosfato de potasio 0.5 M, pH 7.0 también parece extraer lectina pero en menor cantidad que el citrato.

LRA contiene iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ como parte integrante de su estructura (14). Es posible, como lo anotan Kauss y Bowles (11), que en el enlazamiento de la lectina de la raíz a la pared celular estén involucrados iones metálicos de naturaleza desconocida que se re-

muevan mediante los agentes acomplejantes utilizados y permitan la liberación de la lectina. En nuestro caso, el buffer de citrato utilizado tiene un carácter más ácido que el buffer de fosfato, lo cual puede provocar la desestabilización de la pared con la consecuente liberación de la lectina. En la gráfica 1 se muestra el resultado de la elución a través de la columna de Sephadex G-25, utilizando raíces de nueve días de edad y citrato como extractante.

Al eluir con EDTA- Na_2 como segundo extractante, no se presentó eritroaglutinación. Es posible que en el momento de su utilización la lectina se hubiera liberado completamente con el primer extractante.

Diálisis.

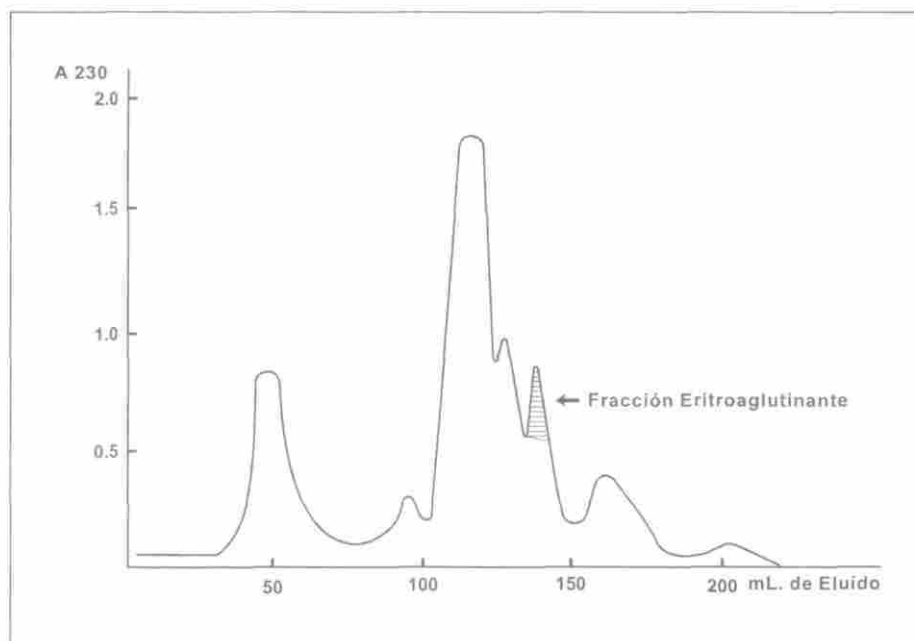
En el dializado, el contenido de proteína (utilizando como criterio del con-

tenido de proteína la lectura de absorbancia a 280 nm) es menor que en el extracto inicial, en forma similar a lo observado en diálisis de lectinas de raíz de haba (16).

En el extracto de raíz probablemente se encuentran varios componentes de carácter peptídico ya que presentan absorción a 230 nm. El soporte utilizado en la columna (Sephadex G-25) trabaja en un rango de peso molecular de 1.000 a 5.000 Da y la membrana de diálisis permite el paso de moléculas con un peso molecular inferior a 10.000 Da. Por lo tanto, LRA debe tener el carácter de oligopéptido o polipéptido pequeño.

Ensayos de aglutinación e inhibición.

Tanto LSA como LRA aglutinan eritrocitos humanos del tipo A+, B+ y O+, de manera inespecífica, lo cual coincide con los resultados de Sharon y Lis (17) para la lectina de semilla.



Gráfica 1. Purificación del extracto de plantas de 9 días de edad a través de una columna de Sephadex G-25. Eluyente: agua desmineralizada.

El llevar el extracto de raíz a un pH neutro provoca la pérdida de la actividad eritroaglutinante de la lectina. El buffer de citrato utilizado como extractante, por sí solo provoca la aglutinación de eritrocitos humanos pero su acción es muy débil y requiere un tiempo superior al de los extractos de raíz.

La tabla 1 muestra los resultados de la inhibición por carbohidratos, de la eritroaglutinación debida a LSA y LRA.

D-glucosa, sacarosa y melezitosa inhiben la eritroaglutinación por LSA. Los tres contienen glucosa con grupos -OH libres en las posiciones 2, 3, 4 y 6. Posiblemente la maltosa (no se utilizó en este ensayo) debe inhibir también la eritroaglutinación de LSA. A diferencia de otros investigadores (17,

18), en este ensayo, la D-mannosa no inhibió la eritroaglutinación. Sin embargo, esta divergencia se podría deber a que la concentración final de manosa, utilizada en este trabajo es dos o cuarenta veces inferior a la utilizada por los investigadores citados (17, 18).

Los diferentes comportamientos de LSA y LRA, en las pruebas realizadas, nos sugieren que se trata de dos lectinas diferentes.

Electroforesis.

En la electroforesis con LSA se obtuvieron dos bandas cercanas entre sí que corresponden a dos isolectinas. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura (9, 15, 16).

Tabla 1. Inhibición por carbohidratos, de la eritroaglutinación debida a LSA y LRA.

| Carbohidrato | Eritroaglutinación por | |
|-----------------------------------|------------------------|-----|
| | LSA | LRA |
| D-glucosa | - | + |
| 2-glucosamina | + | + |
| N-acetil- α -D-glucosamina | + | + |
| D-galactosa | + | + |
| 2-galactosamina | + | + |
| N-acetil- α -galactosamina | + | + |
| Acido galacturónico | + | + |
| D-mannosa | + | + |
| L-fucosa | + | + |
| D-fructosa | + | + |
| D-xilosa | + | + |
| D-arabinosa | + | + |
| L-sorbosa | + | + |
| Mannitol | + | + |
| Lactosa | + | + |
| Sacarosa | - | + |
| Melibiosa | + | + |
| Celobiosa | + | + |
| Melezitosa | - | + |
| Rafinosa | + | + |

Nota: - indica que se inhibió la eritroaglutinación.
+ indica que se presentó eritroaglutinación.

En la electroforesis con LRA no se detectaron bandas a pesar de que se ensayaron diferentes condiciones experimentales. Esto se puede deber a que el contenido de lectina en la raíz es muy bajo y a que después de 7 días sólo hay trazas de lectina en la raíz (18). Por lo mismo, es posible que después de 9 días lo que se encuentre sean productos de degradación de la lectina original, oligopéptidos, por ejemplo (coincidiendo con los resultados de la diálisis), que no son retenidos por el gel.

Determinación del peso molecular de LSA.

El perfil de elución obtenido mostró la presencia de dos picos. El liofilizado del pico 1 presentó eritroaglutinación, indicativo de la presencia de lectinas, mientras que el pico 2 no aglutinó eritrocitos.

La electroforesis en gel de poliacrilamida del pico 1 y de las proteínas patrón mostró que en este pico se encontraban presentes seroalbúmina, ovoalbúmina y LSA. Varias limitantes impidieron la resolución de estas tres proteínas: la principal, las dimensiones de la columna utilizada; mientras el volumen del lecho utilizado por Andrews (19) fue de 240 mL el nuestro fue de sólo 65 mL.

La coelución de las dos proteínas patrón, con pesos moleculares comprendidos entre 43 Kda (ovoalbúmina) y 68 Kda (seroalbúmina bovina), con LSA incluida, indica que esta última debería tener un peso molecular localizado en este rango, el cual coincide con las determinaciones realizadas por varios investigadores (9, 15), los cuales asignan a LSA un peso molecular de 49-54 Kda.

Ensayos de bactoaglutinación

Cuando se mezclaron las 3 cepas de *R. Leguminosarum* bv. *viciae* y LSA, sólo en una de ellas se presentó una muy leve aglutinación, después de 24

horas. No hay, entonces, aglutinación directa entre LSA y *R. Leguminosarum* bv. *viciae*, lo cual coincide con lo reportado por otros investigadores (20, 21). La situación fue similar con LRA.

Agglutinación indirecta.

Las suspensiones bacteriales, por sí solas, no aglutinan eritrocitos. En los casos en que las cepas bacteriales se habían mezclado previamente con LSA y LRA se presentó eritroaglutinación, excepto con las cepas bacteriales de 2 y 8 días de edad. Los resultados indican que la superficie rizobial no tiene una composición constante sino que los determinantes que permiten la unión de la lectina al rizobio se encuentran sólo en períodos transitorios de tiempo lo cual coincide con lo expresado por otros autores (22).

Al tratar LSA o LRA (extraído de plantas de 12 días de edad) con *E. coli* se presentó eritroaglutinación lo cual sugiere que las bacterias rizobiales no son las únicas que poseen los determinantes superficiales que permiten la fijación de la lectina.

AGRADECIMIENTOS

A la Organización de Estados Americanos, OEA, y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero.

REFERENCIAS

1. Hirsch, A.M. *Plant Phytol.*, 1992, 122, 211.
2. Vande Broek, A.; Vanderleyden, J. *Molecular plant microbe interactions*, 1995, 8(6), 800.
3. Díaz, C.L.; Van Spronsen, P.C.; Bakhuisen, R.; Logman, G.J.; Lutenberg, E.J.; Kijne J.W. *Planta*, 1986, 350.

4. Kocourek, J.; Horessi, V. *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, V. 3, Bog-Hansen T.C., Spengler G.A. (eds.): Berlin, New York, 1983, 3.
5. Kijne, J.W.; Díaz, C.L.; Bakhuisen, R. *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, V. 5, Bog-Hansen, T.C., van Driessche E. (eds.): Berlin, New York, 1986, 3.
6. Van Driessche, E.; Beeckmans, S.; Kanarek, L. *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*, Huisman, J., Van der Poel, T.F., Liener, I.E. (eds.): Wageningen, 1988, 67.
7. Long, S.R., Erhardt, D.W. *Nature*, 1989, 338, 545.
8. Mylona, P.; Pawlowski, K.; Bisseling T. *The plant cell*, 1995, 7, 869.
9. Entlicher, G.; Kostir, J.V.; Kocourek, J. *Biochem. Biophys. Acta*, 1970, 221, 272.
10. Kauss, H.; Glaser, C. *FEBS Letters*, 1974, 45, 304.
11. Kauss, H.; Bowles, D.J. *Planta (Berl.)*, 1976, 130, 169.
12. Navarro, Y.; Pérez, G. *Rev. Col. Quím.*, 1978, 8, 25.
13. Andrews, P. *Biochem. J.*, 1965, 96, 595.
14. Hamblin, J.; Kent, S.P. *Nature New Biol.*, 1973, 245, 28.
15. Trowbridge, I.S. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 6004.
16. Allen, A.K.; Desai, N.N.; Neuberger, A. *Biochem. J.*, 1976, 155, 127.
17. Sharon, N.; Lis, H. *Science*, 1972, 77, 949.
18. Díaz, C.L.; Hosselet, M.; Logman, G.J.J.; van Driessche, E.; Lugtenberg, B.J.J.; Kijne, J.W. *Planta*, 1990, 181, 451.
19. Andrews, P. *Biochem. J.*, 1965, 96, 595.
20. Broughton, W.J. *J. Appl. Bacteriol.*, 1978, 45, 165.
21. Rougé, P.; Labroue, L. *Comptes Rendus Hebd Sceances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat.*, 1977, 287, 2423.
22. Mort, A.J.; Bauer, W.D. *Plant Physiol.*, 1980, 66, 158.