

บทบาทของ เลกตินของข้าว (*Oryza sativa* L.) ในการยึดเกาะ
ระหว่าง *Klebsiella* spp. กับ เซลล์ผิวหนัง



นางสาวจิราพร ล้อมปานานนท์

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-496-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013865

I10293A25

Role of Lectin from Rice (*Oryza sativa* L.)
in the Association Between *Klebsiella* spp.
and Root Epidermal Cells

Miss Jiraporn Limpananont

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
Program Biological Sciences
Graduate School
Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-496-1

Thesis Title Role of Lectin from Rice (*Oryza sativa* L.)
in the Association Between *Klebsiella* spp.
and Root Epidermal Cells

By Miss Jiraporn Limpananont

Program Biological Sciences



Thesis Advisor Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirement for
the Degree of Doctor of Philosophy.

Thavorn Vajrabhaya.....Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Kamchad Mongkolkul.....Chairman
(Associate Professor Kamchad Mongkolkul, Ph.D.)

Jariya Boonjawat.....Thesis Advisor
(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Montri Chulavatnatol.....Member
(Professor Montri Chulavatnatol, Ph.D.)

P. Thipayathasana.....Member
(Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.)

Preeda Boon-Long.....Member
(Assistant Professor Preeda Boon-Long, Ph.D.)

Peerada Sirijintakarn.....Member
(Assistant Professor Peerada Sirijintakarn, Ph.D.)

จรรยา สัมปทานนท์ : บทบาทของเลกตินของข้าว (*Oryza sativa* L.) ในการปิดเกาะระหว่าง *Klebsiella* spp. กับเซลล์ผิวราก (ROLE OF LECTIN FROM RICE, *Oryza sativa* L., IN THE ASSOCIATION BETWEEN *Klebsiella* spp. AND ROOT EPIDERMAL CELLS) อ. ที่ปรึกษา รศ.ดร. จริยา บุญวัฒน์, 195 หน้า

การปิดเกาะระหว่าง *Klebsiella* spp. (R15 และ R17) และต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข.7 ที่ปลูกในน้ำกลั่น เป็นผลให้การเจริญของรากขนเพิ่มขึ้น มีการแตกกิ่ง ม้วนงอ และยาวขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็มีการเกาะแน่นของแบคทีเรียบนผิวรากทั้งในลักษณะเซลล์เดี่ยว เป็นกลุ่ม และเกิดเป็นโครงสร้างทรงกลม มีเยื่อหุ้มขนาด 10-15 ไมครอน และพบแบคทีเรียจำนวนมากเข้าไปอยู่ภายในเนื้อเยื่อรากชั้น epidermis และ cortex ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่ย่อยพันธะที่เชื่อมต่อกันของโกลูโคสและเอ็นไซม์ทรินซินที่ย่อยพันธะเปปไทด์ ทำให้ขนาดของโครงสร้างทรงกลมเล็กลงโดยทำลายส่วนนอกของโครงสร้างทรงกลม ประกอบกับได้ตรวจพบแอนติบอดีของเลกตินในสารที่รากปลดปล่อยออกมาและเลกตินที่จับแน่นบนเซลล์ผิวราก จึงเป็นหลักฐานที่สนับสนุนความเป็นไปได้ว่าเลกตินทำหน้าที่เป็นปัจจัยการปิดเกาะ

เพื่อยืนยันบทบาทของเลกตินของข้าวในการปิดเกาะนี้ได้สกัดเลกตินจากราก เอมบริโอ และรำของข้าว กข. 7 เลกตินบริสุทธิ์ที่ได้จากทุกแหล่งมีความจำเพาะกับน้ำตาลหัวเดียวกัน คือ เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22-23K เมื่อวิเคราะห์ด้วยเจลที่แยกขนาดโมเลกุลแบบคอลัมน์ และแบบโพลีอะคริลามัด เลกตินดังกล่าวประกอบด้วย 4 ไอโซเลกติน มีน้ำหนักโมเลกุลคำนวณจากวิธี SDS-PAGE เป็น 24, 22, 20 และ 18K ซึ่งหาค่า pI โดย IEF-SDS PAGE ได้เรียงตามลำดับคือ 4.5, 4.7, 5.0 และ 5.05 เลกตินจากข้าวทุกส่วนเป็นกลัยโคโปรตีน แต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเลกตินจากราก เอมบริโอ และรำ ต่างกัน คิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักคือ 8.1-9.1, 2.8-4.5 และ 0.9-7.5 ตามลำดับ มีความเสถียรในช่วง pH 2-12 และเมื่อละลายที่ pH 7.4 ทนความร้อนได้ถึง 70° ซ นาน 2 ชั่วโมง สมบัติของโมเลกุลเช่นนี้เหมาะสมกับหน้าที่ตัวปิดเกาะในสภาพธรรมชาติของเลกติน

การทดลองโดยใช้เลกตินบริสุทธิ์ยืนยันความสามารถของเลกตินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ *Klebsiella* spp. (R15 และ R17) และทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ปิดเกาะบนรากข้าวที่ได้ล้างเอาเลกตินออกก่อนแล้ว และได้พบตัวรับเลกตินกระจายอยู่บน glycocalyx และผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และอยู่บน glycocalyx ส่วนนอกของเซลล์ผิวราก เมื่อศึกษาด้วยวิธีติดฉลากด้วยอนุภาคทองและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแสงผ่าน นอกจากนี้ได้แสดงว่าตัวรับเลกตินบนแบคทีเรียสามารถจับกับเลกตินบริสุทธิ์ที่สกัดจากราก รำ และเอมบริโอ ได้เหมือนกัน และถูกยับยั้งด้วยน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน เมื่อศึกษาด้วยเลกตินที่ติดฉลากด้วยคาร์บอน-14 และแข่งขันการจับด้วยเลกตินจากรำ ราก และน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน ดังนั้นผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ว่าเลกตินของข้าวเป็นตัวปิดเกาะระหว่าง *Klebsiella* spp. (R15 และ R17) กับรากข้าว (กข. 7) ตามสมมติฐานของ Hamblin และ Kent (1973) ว่าด้วยการจับที่อาศัยเลกติน



JIRAPORN LIMPANANONT : ROLE OF LECTIN FROM RICE (Oryza sativa L.)
IN THE ASSOCIATION BETWEEN Klebsiella spp. AND ROOT EPIDERMAL CELLS.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D. 195 pp.

The association between Klebsiella spp. (R15 and R17) and rice (cv. RD7) seedlings grown in sterile water resulted in curling, branching, denser and longer root hairs, together with firm adherence of bacteria on the rhizoplane as individual cells, clusters and eventually as enveloped micronodule structures of 10-15 μ in diameter. Invasion of a few bacterial clusters was also found in the epidermal and outer cortical layers of rice root. Shrinkage and degradation of these micronodules treated with glucan-digesting enzymes and trypsin, and detection of lectin activity in the root exudate and bound lectin on outer epidermal cells, support the role of rice lectin as an associative factor.

To confirm the role rice lectin in Klebsiella spp. and rice association, lectins were purified from root, embryo and bran of rice cv.RD7. All these rice lectins exhibit similar sugar-binding specificity with N-acetylglucosamine, their approximate molecular weight of 22-23K on molecular sieve and polyacrylamide gel can be resolved in 4 isolectins of apparent M.W. 24, 22, 20 and 18 K by SDS-PAGE with corresponding pI of 4.5, 4.7, 5.0 and 5.05 shown by two-dimensional IEF-SDS PAGE. They are all glycoproteins with different carbohydrate content of 8.1-9.1, 2.8-4.5 and 0.9-7.5 %w/w for root, embryo and bran lectin respectively. They are stable in pH ranging from 2-12 and withstand heating upto 70°C for 2 h. These molecular characteristics support for the persistence and binding ability of rice lectin in natural condition.

Experiments performed with purified lectins confirm their ability to agglutinate Klebsiella spp. (R15 and R17) and their adhesive function in association of these diazotrophs on the previous lectin-diminished rice roots. Lectin receptors were demonstrated to distribute on glycocalyx and cell wall of bacteria, and on glycocalyx at the outer periphery of epidermis by colloidal gold labelling TEM. In addition, the binding study with ¹⁴C-embryo lectin and competitive binding study indicate that lectins purified from any sources of rice occupy the same receptors on bacteria. All these lectin-mediate bindings can similarly be inhibited by GlcNAc with the same degree of specificity. These results indicate the function of rice lectin in the association between Klebsiella spp. (R15 and R17) and rice (cv. RD7) root in similar way as proposed by Hamblin and Kent (1973) in the "Lectin-binding hypothesis".



ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to my advisor, Dr. Jariya Boonjawat, for her invaluable supervision, encouragement and supports throughout my study.

I am very grateful to Dr. Kamchad Mongkolkul, Dr. Montri Chulavatnatol, Dr. Pairor Thipayathasana, Dr. Preeda Boon-Long and Dr. Peerada Sirijintakarn for serving as thesis committee, and their constructive criticisms and comments.

Sincere appreciation is expressed to Dr. Marc Horisberger, Miss M.-F. Clerc, Associate Professor Montakorn Vajrabhaya, Dr. Wattana Wattanavijarn, Dr. Suganya Soontaros, Dr. Tipaporn Limpaseni, and Dr. Preeda Chaisiri for their great helps, guidances, and suggestions in several laboratory techniques. Thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their helps in the laboratory and discussion with sincerity and friendships, and to Miss Pornpimol Korntip for her kind assistance in collecting rabbit blood.

I wish to acknowledge the contributions of the United Nation University and the Graduate School, Chulalongkorn University for financial support, of Biochemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University for all laboratory facilities and equipments, and of Scientific and Technological Research Equipment Center, Chulalongkorn University for laboratory equipments of electron microscopes and amino acids analyzer under the technical assistances of Miss Amporn Eongprakornkeaw, Miss Siripen Vethchagarun and Miss Sathorn Suwan. I am very indebted to Chulalongkorn University for granting my study leave.

I wish to thank Asst. Prof. Somchai Mekaroonrean for his help in data computerized analysis and in preparing this thesis, and also Miss Maneerat Niumnopetra and Miss Vitoon Keawtrirat for typing the manuscript.

Finally, I am most grateful to my parents and members of my family for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS



THAI ABSTRACT.....iv
ENGLISH ABSTRACT.....v
ACKNOWLEDGEMENT.....vi
CONTENTS.....viii
LIST OF TABLES.....xiii
LIST OF FIGURES.....xiv
ABBREVIATIONS.....xvii

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Rice.....1
1.2 Environmental condition in flooded
rice soil.....3
1.3 Biological nitrogen fixation in
lowland rice.....7
1.4 The association between diazotrophs
and Gramineae.....14
1.5 Recognition, Attachment and the Lectin
Hypothesis.....17
1.6 Rice lectin.....25
1.7 The aims of this thesis.....30

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacteria.....32
2.2 Rice.....32
2.3 Radioactive isotopes and chemicals
for scintillation counting.....33
2.4 Chemicals for epi-fluorescence and
electron microscopy.....33

2.5	Enzymes, sugars and culture media.....	34
2.6	Materials for gas chromatography.....	34
2.7	Materials for column-chromatography.....	35
2.8	Materials for polyacrylamide gel electrophoresis.....	35
2.9	Preparation of culture media.....	36
2.10	Maintenance of bacterial cultures.....	37
2.11	Cultivation of nitrogen-fixing bacteria..	38
2.12	Preparation of rice seedlings.....	38
2.13	Preparation of root exudate.....	39
2.14	Bacterial inoculation for microscopic studies.....	39
2.15	Observation by epi-fluorescence microscopy.....	40
2.16	Preparation of root samples for eletron microscopy.....	41
2.17	Preparation of bacterial samples for electron microscopy.....	44
2.18	Enzyme treatment of bacterial associated rice root.....	44
2.19	Acetylene Reduction Activity(ARA) assay..	45
2.20	Protein determination.....	46
2.21	Hemagglutination assay.....	46
2.22	Determination of bound lectin on root surface by competitive binding assay.....	48
2.23	Isolation of rice lectin from bran, embryo and root.....	51
2.24	Affinity chromatography.....	52
2.25	Chromatography on Sephadex G-100.....	55

2.26	Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE).	56
2.27	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis...	57
2.28	Isoelectric focusing(IEF) gel electrophoresis.....	58
2.29	IEF-SDS two dimentional electrophoresis..	60
2.30	Determination of the carbohydrate content in lectin.....	61
2.31	Amino acids composition of lectin.....	61
2.32	Stability test for lectin.....	62
2.33	Radiolabelling of rice lectin.....	63
2.34	Bacterial agglutination test.....	64
2.35	Binding activity of radiolabelled rice lectin.....	64
2.36	Localization of lectin receptors utilizing colloidal gold as marker.....	66

III RESULTS

3.1	Interaction between associative nitrogen-fixing bacteria and rice plant..	71
3.1.1	Attachment.....	71
3.1.2	Deformation and branching of root hairs.....	73
3.1.3	Ultrastructure of micronodules.....	73
3.1.4	Effect of enzyme treatment on the micronodules.....	79
3.1.5	Micronodules and nitrogen-fixing activity.....	82

3.2	Free lectin in root exudate.....	86
3.3	Bound lectin on epidermal cells of rice root.....	87
3.4	Purification of rice lectin.....	91
3.5	Characterization of rice lectin.....	99
3.5.1	Molecular weight.....	99
3.5.2	Subunit molecular weight by SDS-PAGE.....	99
3.5.3	Isoelectric points of rice lectin...	105
3.5.4	Amino acids composition of purified rice lectin.....	110
3.5.5	Amount of carbohydrate in rice lectin.....	112
3.5.6	Stability of rice lectin.....	112
3.6	Bacterial agglutination by rice lectin..	115
3.7	Binding of rice embryo lectin to R15 and R17.....	115
3.8	Competitive binding assay of embryo lectin receptor.....	119
3.9	Enhancement of bacterial attachment by addition of root exudate or lectin...	121
3.10	Localization of lectin receptor by colloidal gold technique.....	123
3.11	Localization of bacterial lectin receptor.....	129
3.12	Localization of lectin receptor on rice epidermis.....	135

IV DISCUSSION

4.1	Association between <i>Klebsiella spp.</i> R15, R17 and rice (cv RD7) in hydroponic culture.....	141
4.1.1	Changes in root morphology.....	141
4.1.2	Colonization and spherical micronodule formation.....	145
4.1.3	The invasion of diazotrophs into root tissue.....	147
4.2	Micronodule formation and N ₂ -fixation...	149
4.3	The role of rice lectin as associative factor.....	150
4.3.1	Localization of rice lectin in the vicinity of rice rhizosphere.	151
4.3.2	Localization of lectin receptors on <i>Klebsiella spp.</i> R15, R17 and rice (cv. RD7) root.....	153
4.3.3	Effect of purified rice lectin on bacterial association with rice root.....	159
	1) Molecular characteristics of purified rice lectins.....	159
	2) Bacterial agglutination by purified rice lectins.....	162
	3) Enhancement of bacterial association with rice root....	162
4.4	Lectin-binding hypothesis.....	163
	REFERENCES.....	167
	APPENDIX.....	191
	BIOGRAPHY.....	195

LISTS OF TABLES

Table	Page
1 Major groups of N ₂ -fixing microorganisms in lowland rice fields.....	11
2 The original information of N ₂ -fixing bacteria isolated from acid soil and semi-acid soil of Thailand.....	15
3 Some characteristics of rice lectins reported by different research groups.....	27
4 Comparison of amino acids composition of rice lectin reported from different research groups.....	28
5 Micronodule formation and ARA of different rice varieties in association with various reference bacteria.....	83
6 Lectin in root exudate of rice.....	88
7 Specific binding of ¹⁴ C-GlcNAc to bound lectin on epidermal cells of rice root.....	90
8 Rice bran lectin binding capacity of prepared GlcNAc Sepharose 6B affinity gel, Selectin 1 and chitin column.....	92
9 Purification of rice lectin from bran embryo and seedling root of rice (<i>Oryza sativa</i> RD 7).....	98
10 Amino acids composition of purified rice lectin.....	111
11 The amount of carbohydrate in rice lectin.....	113
12 Characterization of lectin binding sites on R15 and R17 by different models of cooperativity.....	118
13 Effect of rice lectin on the attachment of R15 and R17 to PBS-washed excised roots of rice (cv. RD7).....	122
14 Physical data of prepared gold colloids.....	124
15 Plant lectins proposed to function in binding bacteria to plant surfaces.....	167

LISTS OF FIGURES

Figure	Page
1. Biological N ₂ -fixation in wetland rice ecosystem.....	4
2. Epi-fluorescence micrographs of rice (cv.RD7) seedling root with attached <i>Klebsiella spp.</i> R15 and R17.....	72
3. Scanning electron micrographs of rice (cv.RD7) seedling root with attached <i>Klebsiella spp.</i> R15 and R17.....	74
4. Scanning electron micrographs of a freeze-fractured root sample showing the ultra-structure micronodules.....	76
5. Cross-section of rice seedling-root (7-day-old) and 2 markers used to locate epidermal cells are indicated.....	77
6. Transmission electron micrographs of rice (cv.RD7) seedling root in association with <i>Klebsiella sp.</i> R17.....	78
7. Epi-fluorescence micrographs of micronodules of R17 on rice (cv.RD7) seedling root showing the effect of enzymes on micronodules structure.....	80
8. Scanning electron micrographs of micronodules of R17 on rice (cv.RD7) seedling root showing the effect of enzymes on micronodule structure.....	81
9. Nitrogen-fixing activity by ARA of rice RD7 in association with various bacteria.....	85
10. Purification of rice lectin on epoxy-Sepharose B-GlcNAc column.....	93
11. Purification of rice lectin on Selectin 1 column.....	95
12. Purification of rice lectin on chitin column eluted with 0.05 N HCl.....	96

Figure

Page

13. Purification of rice lectin on chitin column eluted with 1% w/v chitin hydrolysate...97
14. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified rice lectin.....100
15. Elution profile of purified rice lectins on Sephadex G-100 column.....101
16. SDS gel electrophoresis of purified lectins...102
17. SDS-gel electrophoresis of rice lectin in reduced and non-reduced conditions.....104
18. Isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis of embryo and root lectin.....106
19. The lectin activity of various isoelectric bands of embryo lectin and root lectin after IEF gel electrophoresis.....108
20. Protein pattern of IEF-SDS 2-dimensional electrophoresis of rice lectin from embryo and root109
21. Percentage of specific hemagglutinating activity after treatment rice lectin in various temperature and hydrogen ion concentration.....114
22. Bacterial agglutination by rice lectin.....116
23. Scatchard plot of specific binding of ^{14}C -EL to *Klebsiella* spp. R15 and R17.....117
24. Competitive binding assay using EL, RL, and GlcNAc as competitors.....120
25. Adsorption isotherm of rice root lectin and ovomucoid on colloidal gold.....127
26. The pH adsorption isotherm of rice root lectin and ovomucoid on colloidal gold.....128
27. Ultrastructural localization of gold-labelled lectin receptors on the surface of bacteria R15 and R17 cultivated in rich medium (RM) by direct labelling.....131

Figure	Page
28. Ultrastructural localization of gold labelled lectin receptors on the surface of bacterial R15 and R17 cultivated in RM by indirect labelling.....	132
29. Ultrastructural localization of gold labelled lectin receptors on the surface of bacteria R15 and R17 cultivated in NF medium by direct labelling.....	133
30. Ultrastructural localization of gold labelled lectin receptors on the surface of bacteria R15 and R17 cultivated in NF medium indirect labelling.....	134
31. Ultrastructural localization of gold labelled lectin receptors on glutaraldehyde-fixed root epidermis by direct labelling.....	137
32. Ultrastructural localization of gold labelled lectin receptors on root epidermis of rice (cv. RD7) by direct labelling.....	138
33. Ultrastructural localization of gold labelled lectin receptors on glutaraldehyde-fixed root epidermis by indirect labelling.....	139
34. Ultrastructural localizatin of gold-labelled lectin receptors on root epidermis by indirect labelling.....	140
35. Lectin-binding hypothesis : Role of rice lectin.....	163



ABBREVIATIONS

A ₂₈₀	Absorbancy at wavelength of 280 nanometer
ARA	Acetylene reduction activity
AS-60	Precipitate after addition of ammonium sulfate 60%
Au ₅	Gold particle of diameter 5 nm
Avg	Average
BGA	Blue-green algae
BL	Rice bran lectin
BNF	Biological nitrogen fixation
cfu	Colony-forming unit
cv.	Cultivar
d	Day
DNA	Deoxyribonucleic acid
dpm	Di integration per minute
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EL	Rice embryo lectin
EPS	Exopolysaccharide
FID	Flame-ionization detector
g	Gram
GA	Giberellic acid
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine
h	Hour

ha	Hectare
HCCMM	Hua-chou-chi-mo-mor
HU	Hemagglutination unit
IAA	Indole acetic acid
IEF	Isoelectric focusing
in	Inch
IRRI	International Rice Research Institute
K_a	Affinity constant
kg	Kilogram
kV	Kilovolt
l	Litre
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
M	Molarity
mA	Milliampere
ManN	Mannosamine
mCi	Millicurie
MeSH	Mercaptoethanol
mg	Milligram
min	Minute
ml	Millilitre
m mol	Millimole
N	Normality
NF	Nitrogen-free medium

nm	Nanometer
OV-Au	Ovomucoid and gold complex
O.D.	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PCA	Perchloric acid
PEG	Polyethylene glycol
POPOP	1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene
PPO	2,5-diphenyl oxazole
RL	Rice root lectin
RL-Au	Root lectin and gold complex
RM	Rich medium or Nitrogen rich medium
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Scanning electron microscopy
SF-8	Supernatant fraction after 7,020 g (8000 rpm) centrifugation
TBS	Tris-buffer saline
TEM	Transmission electron microscopy
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
v/v	Volume by volume
w/w	Weight by weight
WGA	Wheat germ agglutinin
°C	Degree Celcius
μ	Micron
μg	Microgram
μl	Microlitre