

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE ISOENZIMAS ESTERASAS EN *LEMNA AEQUINOCTIALIS* Y *LEMNA VALDIVIANA* (LEMNACEAE) DE COSTA RICA

Sharon Jiménez Delgado, Elizabeth Salas, Freddy Acuña López
Laboratorio de Genética Molecular, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

RESUMEN

La familia Lemnaceae carece de características morfológicas y anatómicas con fines comparativos y por ello se recurre a estudios moleculares para una diferenciación más precisa. En Costa Rica encontramos del género *Lemna* dos especies: *Lemna aequinoctialis* y *Lemna valdiviana*. Con el objetivo de una caracterización molecular y diferenciación de ambas especies se extrajeron isoenzimas esterasas. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Se utilizó la técnica electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Se encontró diferencia en el patrón de isoenzimas entre ambas especies. De acuerdo con previos estudios moleculares basados en la morfología y anatomía, flavonoides, isoenzimas y secuencias de ADN de ciertos genes, ambas especies son muy distintas; además pertenecen a grupos monofiléticos diferentes. Por su parte, la importancia de esta caracterización molecular radica en su posible uso como biorremediadoras, pues las esterasas han tenido un importante papel en la biorremediación. Asimismo, especies de la familia Lemnaceae son muy utilizadas en el tratamiento de aguas como biorremediadoras.

Palabras claves: Lemnaceae, *Lemna*, isoenzimas, esterasas, biorremediación.

ABSTRACT

The Lemnaceae family lacks morphologic and anatomical characteristics with comparative aims and for that reason the molecular studies has been necessary

a differentiation. In Costa Rica there are two species of *Lemna*: *Lemna aequinoctialis* and *Lemna valdiviana*. With the objective of a molecular characterization and differentiation of both species were extracted isoenzymes esterasas. The study was carried out in the Molecular Genetics Laboratory of the School of Biological Sciences at Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. The technical electrophoresis in gel of polyacrylamida SDS-PAGE was used. It was difference in the pattern of isoenzymes between both species. According to previous molecular studies based on morphology and anatomy, flavonoides, isoenzymes, and DNA sequences of certain genes both species are very different; in addition they belong to different monophyletics groups. On the other hand, the importance of this molecular characterization is its possible use in water treatment, because the esterasas have had important in the bioremediation. Also, species of the Lemnaceae family are used in the water treatment like bioremediation.

Keywords: Lemnaceae, *Lemna*, isoenzyme, esterasas, bioremediation.

INTRODUCCIÓN

La familia Lemnaceae (monocotiledóneas) son plantas acuáticas formadas por cinco géneros y 38 especies, representan las angiospermas más pequeñas del mundo. Se localizan en todos los continentes excepto la Antártica, su amplio rango de distribución hace que cada género y especie posea una distribución característica (Cross, 2002).

Para realizar este estudio se utilizaron dos especies del género *Lemna*: *Lemna aequinotialis* y *Lemna valdiviana*. Una de las especies de Lemnaceae con mayor distribución geográfica es *Lemna aequinotialis* (Crawford et al., 2001), crece en regiones tropicales y subtropicales y ha sido introducida en regiones templadas. En Costa Rica crece desde el bosque seco a muy húmedo, estanques y lagunas poco profundas; distribuida a lo largo de la vertiente del caribe y el pacífico. *Lemna valdiviana* se puede encontrar en la Cordillera Volcánica Central, Cordillera Volcánica de Talamanca y Fila Costeña (alrededores de San Vito). Sin embargo, puede crecer en el bosque muy húmedo, albercas y lagos poco profundos, pantanos y rocas húmedas. Crece en hábitats más húmedos y en elevaciones más altas que *L. aequinotialis* (Grayum, 2003).

Estas especies poseen gran cantidad de proteína que las han convertido en una rica fuente de alimento para diversos animales, además recientemente se les ha atribuido un alto potencial biorremediador (Valderrama et al., 2002).

De esta forma, en los últimos años, se han intensificado los estudios en la caracterización y diferenciación en este género. Sin embargo, este grupo posee una información insuficiente para estudios filogenéticos, debido a que carece de propiedades morfológicas y anatómicas para fines comparativos (Les et al., 2002). Es por esto y con el fin de obtener datos más precisos con respecto a la variación geográfica dentro de especies, divergencia genética y la relación entre especies, que se recurre a estudios moleculares (Crawford et al., 2001).

Estudios recientes han investigado isoenzimas y ADN. De esta manera se ha iniciado un estudio filogenético intenso, reuniendo datos de una extensa variedad de fuentes como: morfología, macromoléculas, isoenzimas y secuencias de ADN (Les et al., 2002).

Los estudios en los patrones de enzimas contribuyen al conocimiento de la variabilidad de diferentes especies. Este análisis permite establecer diferencias no detectables desde el punto de vista morfológico (Estrada et al., 1997). Por lo tanto, la variación isoenzimática en el nivel intraespecífico ha sido estudiada en varias especies, con el fin de

diferenciar poblaciones dentro de una especie o complejo de especies. Por ende, las diferencias en los patrones electroforéticos son de gran importancia sistemática, pues además indican una variación en la estructura de las proteínas como un efecto directo de la variación génica entre taxones (Solís y Faloci, 2000).

Por otra parte, las esterasas son enzimas que han mostrado un papel importante en el tratamiento de aguas contaminadas, pues se han detectado en plantas responsables de la destoxicación y degradación de varios pesticidas (Karthikeyan et al., 2005). Especies de la familia Lemnaceae son de las más utilizadas en el tratamiento de aguas y han revelado un importante papel en la biorremediación (Valderrama et al., 2002). Existen trabajos en los que se demuestra la intervención de las esterasas en la resistencia a organofosforados y piretroides; y se ha sugerido su participación en la destoxicación de los carbamatos.

Además, estudios electroforéticos muestran un gran polimorfismo para las enzimas esterasas en poblaciones de insectos, relacionadas de forma diversa en la resistencia a insecticidas (Bisset et al., 1996). Por ejemplo, se ha descrito la presencia de enzimas esterasas destoxicantes en cepas resistentes a organofosforados en larvas de *B. microplus* (Bisset et al., 1996).

Con el objetivo de una caracterización molecular para la diferenciación de estas especies, se extrajeron isoenzimas esterasas de *Lemna aequinotialis* y *Lemna valdiviana*. Por su parte, la importancia de esta caracterización molecular en estas especies, y la presencia de estas enzimas esterasas, radica en su posible uso como biorremediadoras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Para el análisis electroforético se utilizó gel de poliacrilamida SDS PAGE, según el protocolo de Laemmli, 1970. El análisis estadístico se realizó con el programa Biodiversity Pro versión 2, Londres, UK. Para la preparación de la muestra de *Lemna valdiviana* se homogeneizó en un mortero con

buffer de extracción (buffer separador 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.08%) en relación de 1 gramo de muestra/2 ml, 100 ul PVPP 10% y una punta de arena. Luego se centrifugó a 10.000 rpm 4 minutos. El miliamperaje fue de 2 a 11 mA durante 6 horas, aumentando el amperaje aproximadamente 2 mA cada hora. En *Lemna aequinocialis* se homogeneizó con buffer de extracción (buffer separador 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,08%, SDS 10% y 2-mercaptoetanol), y el miliamperaje fue de 2 a 4 mA durante 3 horas y media. Para el revelado del gel se utilizó alfa naftil acetato, beta naftil acetato y fast blue RR-salt. Se calcularon los Rf (movilidad electroforética relativa) para cada una de las bandas isoenzimáticas según Lomonte, 1991.

RESULTADOS

El análisis estadístico realizado con la prueba Kruskal-Wallis mostró que no existe similitud (0%) entre estas dos especies.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

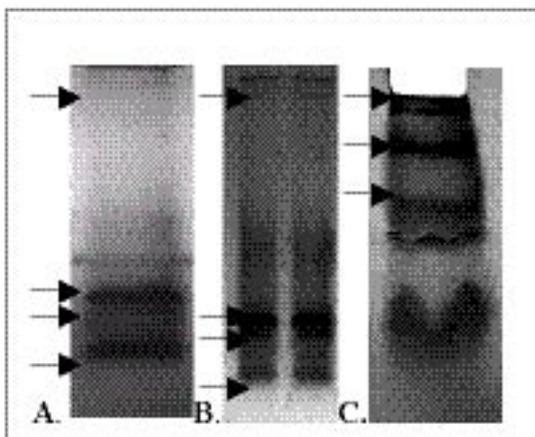


Figura 1. Patrón de isoenzimas esterases. A) Gel discontinuo SDS PAGE al 10 y 4%. Presencia de cuatro bandas de esterases en *Lemna valdiviana*. B) Gel discontinuo SDS PAGE al 12 y 4%. Presencia de cuatro bandas de isoenzimas en esterases en *Lemna valdiviana*. C) Gel continuo SDS PAGE al 10%. Presencia de tres bandas de isoenzimas esterases en *Lemna aequinocialis*.

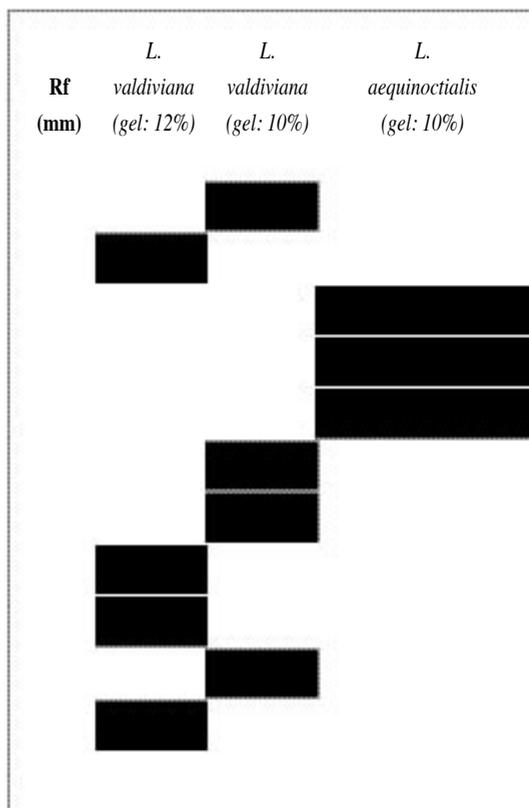


Figura 2. Muestra el patrón de bandas isoenzimas esterases. *Lemna valdiviana* (gel separador 12%). *Lemna valdiviana* (gel separador 10%). *Lemna aequinocialis* (gel separador 10%). Rf (movilidad electroforética relativa) según Lomonte, 1991.

El distinto patrón de isoenzimas esterases en ambas especies puede deberse a que pertenecen a grupos monofiléticos distintos. Estudios basados en un amplio análisis filogenético que incluye todas las especies de Lemnaceae actuales, usando más de 4 700 caracteres que incluyen morfología y anatomía, flavonoides, isoenzimas y secuencias de ADN de ciertos genes de cloroplasto e intrones, representan a ambas especies en grupos monofiléticos distintos (Les et al., 2002). El análisis de isoenzimas permite diferenciar especies muy similares entre sí. En el caso de *Lemna aequinocialis*, que ha sido comparada con *Lemna perpusilla*, a pesar de que las dos especies comparten una alta identidad de loci de

isoenzimas más que otra especie de *Lemna* y son parecidas en morfología y secuencias de ADN, se consideran distintas especies debido a sus diferentes patrones de isoenzimas (Crawford et al., 2001).

Teóricamente, la aparición de isoenzimas puede estar relacionada con la contaminación específica del medio ambiente. Estudios en especies de la familia Lemnaceae expuestas y no expuestas a aguas contaminadas con metales pesados han mostrado variación de isoenzimas en estererasas. La presencia de más isoenzimas en la población expuesta a metales pesados puede cumplir un rol importante en la adaptación de *Lemna* a estas condiciones (Suman et al., 2004). Por lo tanto, estudios de polimorfismos de isoenzimas pueden servir como un sistema de monitoreo para evaluar efectos de estrés en contaminaciones específicas al medio ambiente.

Por otra parte, estudios en *Lemna minuscula* perteneciente al mismo grupo monofilético de *Lemna valdiviana* han demostrado una viabilidad en combinación con microalgas para la biorremediación de desechos industriales recalcitrantes sobre el agua (Valderrama et al., 2002). Asimismo, otras especies han sido utilizadas en esta área, como en el caso de *Lemna gibba* para el tratamiento de desechos domésticos en ciertas condiciones, con el fin de precipitar nitrógeno y lograr una reutilización de nutrientes (Zimmo et al., 2004). De esta manera, la presencia de enzimas estererasas en *L. valdiviana* y *L. aequinoctialis* abre las puertas para más investigación, con el fin de determinar cuáles son específicamente. También, se podría evaluar en estanques con estas dos especies como una opción para el tratamiento de aguas sucias, aspirando a una recuperación y reutilización de nutrientes.

En Costa Rica el deterioro de ambientes atmosféricos, acuáticos y terrestres ha sido lento y evidente. Sin embargo, muchas industrias han implementado tecnologías limpias, pero a un paso lento (Alfonso, 2002). Por tanto, el estudio de posibles plantas biorremediadoras, como son estas dos especies, da la posibilidad de una opción económica y con menos daño al ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, M. 2002. *Hacia una propuesta de agenda ambiental, foro ambiental, área temática de contaminación y producción limpia*. Fundación CR-USACATIE Corredor Biológico Mesoamericano UCI WCS CONARE – CENAT.
- Bisset, Juan A., Dieguez, Lorenzo y Rodríguez, María M. 1996. “Tres combinaciones de estererasas y su relación con la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) de Cuba”. *Rev. Cubana Med. Trop.* Vol. 48, Nº 1, pp. 5-11. ISSN 0375-0760.
- Crawford, D.J., Landolt, E., Les, D.H and Kimball, R.T. 2001. “Allozyme studies in Lemnaceae: variation and relationships in Lemna sections Alatae and bifformes”. *Taxon* 50: 987-999.
- Cross, J.W. 2002. *The Charms of Duckweed* [en línea]. Consultado 10 de nov. del 2005. Disponible en <http://www.mobot.org/jwccross/duckweed.html>
- Estrada, M., Piñon, D. y Capote, M. 1997. “Variabilidad de las estererasas de *Metarhizium anisopliae*”. *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 29-30.
- Grayum, M.H. 2003. *Lemnaceae* [en línea]. Consultado 10 de nov. del 2005. Disponible en http://www.inbio.ac.cr/papers/manual_plantas/Textos%20revisados/Lemnabor.html
- Karthikeyan, R., Davis, Lawrence, Erickson, Larry E., Al-Khatib, Kassim, Kulakow, Peter A., Barnes, Philip L., Hutchinson, Stacy L. and Nurzhanova, Asil A. *Studies on responses of non-target plants t pesticides: review* [en línea]. Consultado 10 de nov. del 2005. Disponible en <http://www.engg.ksu.edu/hsrc/Publications.html>
- Les, D.H., Crawford, D.J., Landolt, E., Gabel, J.D. and Kimball, R.T. 2002. “Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family”. *Systematic Botany* 27 (2): 221-240.
- Lomonte, V.B. 1991. “Curso Métodos Inmunoquímicos”. *Manual de laboratorio*. Universidad de Costa Rica. Programa de Maestría en Microbiología, Parasitología y Química Clínica. Mimeografiado. Pp. 33-43.
- Sabine, Körner, Vermaat, Jan E. and Siemen, Veenstra. “The Capacity of Duckweed to Treat Wastewater”. *J. Environ. Qual.* 32: 1583-1590.
- Solís, V. y Faloci, M. 2000. *Estudios biosistemáticos en el complejo Turnera sidoides L. (Turneraceae, Leiocarpae). II - Caracterización isoenzimática*. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Córdoba-UNNE, Argentina.
- Suman, Mukherjeea, Swati, Mukherjeea, Bhattacharyyab, P. and Duttaguptaa, A.K. 2004. “Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies”.

- Rev. Environment International* 30: 811-814.
- Valderrama, L., Del Campo, C., Rodríguez, C., De-Bashan, L., Bashan, Y. 2002. "Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscule*". *Water Research* 36: 4185-4192.
- Zimmo, O., Van Der Steen, N., Gijzen, H. 2004. "Nitrogen mass balance across pilot-scale algae and duckweed-based wastewater stabilization ponds". *Water Research* 38: 913-920.