UNICIENCIA 22
pp. 33-37
2008

DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE *LEMNA AEQUINOCTIALIS* Y *L. VALDIVIANA* (LEMNACEAE) POR PATRONES PROTEICOS

Mª del Milagro Montero Rojas, Elizabeth Salas Zúñiga, Freddy Acuña López
Laboratorio de Genética Molecular, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

RESUMEN

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Se utilizaron plantas acuáticas macrófitas de *Lemna valdiviana* y *L. aequinoctialis* previamente identificadas. Estas especies habitan en aguas ricas en sales disueltas y aguas servidas. Recientemente se les consideró como un indicador de la contaminación ocasionada por pesticidas y herbicidas en el agua. La composición proteica llega a niveles entre 38 y 43% de materia seca, importante para diversos usos. La extracción de proteínas totales, por medio de electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida, se realizó en condiciones reductoras con SDS (SDS-PAGE). Los geles separadores empleados fueron al 8 y 10%, gel espaciador al 4% y la tinción se efectuó con azul commassie. Los diversos patrones proteicos reflejaron diferencias genéticas entre ambas especies que se pueden deber a las diferencias de hábitat y de reproducción.

Palabras claves: *Lemna valdiviana*, *L. aequinoctialis*, proteínas totales, electroforesis.

ABSTRACT

This study was done at the Molecular Genetics Laboratory of Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Previously identified macrophyte aquatic plants *Lemna valdiviana* and *L. aequinoctialis* were used. Usually these species are found in residual water or salt rich water. Recently these species have been considered as indicators of contamination caused by pesticides and herbicides present in the water. Their protein composition achieves levels as high as 38-43% of dry matter, which is important for different practical purposes. Total protein extraction was carried out in reducing conditions, using discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis with SDS (SDS-PAGE). Stacking gels were 8 and 10%, resolving gel was 4% and running time was 3-4 hours. Gels were dyed with Coomasie blue. Protein patterns showed genetic differences between both species which might be due to differences in the habitat and in their reproduction type.

Keywords: *Lemna valdiviana*, *L. aequinoctialis*, total protein, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

Las lentejas de agua (Lemnáceas) son plantas macrófitas, en forma de roseta, con hojas aéreas y flotantes en la superficie. La mayoría de estas especies de roseta son perennes y existe una fuerte tendencia a su reducción estructural (Landesman et al., 2005). En Costa Rica, las especies de Lemnaceae se distribuyen de forma muy diferente (Grayum, 1986). *Lemna aequinoctialis* se ubica en el bosque seco a muy húmedo, estanques, lagunas, canales y ciénagas poco profundos, en bosques o sitios abiertos, 0-850 m; a lo largo de ambas vertientes, además las especies son fértiles (Grayum, 1986). *Lemna valdiviana* se encuentra en bosques muy húmedos, albercas y lagos poco profundos, pantanos y rocas húmedas, 600-1500 m; en la vertiente atlántica y Cordillera Volcánica Central (Zarcero, Vara Blanca) (Lago Dabagri), vertiente pacífica y Cordillera de Talamanca (Río Ceibo), Fila Costeña (alrededores de San Vito). Además *L. valdiviana* es más frecuente en hábitats más húmedos y en

Recibido 1/11/2006 / Aceptado 31/12/2006

elevaciones más altas que *L. aequinoctialis*. En Costa Rica, el material que se encuentra es estéril (Grayum, 1986). También es frecuente encontrar estas especies en aguas ricas en sales disueltas, aguas servidas y con alto contenido de nutrientes; por ese motivo mediante recientes investigaciones se les consideró como un indicador de la contaminación de aguas causada por pesticidas y herbicidas (Davy et al., 2003). Algunas especies, como *Lemna aequinoctialis* Welwitsch, se han usado para bioensayos toxicológicos en los medios tropicales (Bengtsson, 1999). Estas especies además tienen la capacidad de crecer rápidamente y producir biomasas ricas en proteínas (El-Shafai et al., 2004). Su composición proteica que llega a niveles entre 38 y 43% en materia seca (Leng et al., 1995), junto con otras cualidades minerales, permite a la planta una vez cosechada, ser promisoria para fines alimenticios. Estudios anteriores han demostrado que la proteína de las "lentejas de agua" tiene un mejor arreglo de aminoácidos esenciales que otros vegetales, esto la convierte en una fuente de alta calidad proteica para la alimentación de animales domésticos como cerdos y pollos (Thi Kim Khang, 2004) y en el cultivo de peces (Leng et al., 1995).

Las características de estas especies han aumentado su valor económico y biorremediador, de ahí que su identificación y caracterización molecular sean de gran importancia. En este aspecto, las técnicas de separación, como la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), son un gran apoyo a los criterios morfológicos tradicionales y en el nivel filogenético permite la delimitación dentro y entre especies y han sido usadas en la identificación de aislamientos de especies (Sanabria et al., 2002).

El objetivo de esta investigación fue diferenciar genéticamente a *Lemna valdiviana* y *L. aequinoctialis* para contribuir a los estudios filogenéticos y maximizar los usos que se les pueden dar a estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional en Heredia, Costa Rica, por un período comprendido entre febrero del 2004 y noviembre del 2005.

Identificación y cultivo de las especies de Lemna: Ambas especies se identificaron taxonómicamente y se cultivaron en estanques grandes, dentro de la Universidad Nacional, en un área abierta, en la cual se alternaban de forma natural los períodos de luz y sombra. Los estanques se llenaron con agua de lluvia y de tubería; regularmente se les alimentaba con agua contaminada de lechería, observando el crecimiento.

Extracción de proteínas totales: Se tomaron muestras recién sacadas de los estanques y se pesó 1 g de muestra. Ambas especies se maceraron en vasijas de porcelana y morteros fríos. *Lemna valdiviana* se suspendió por 5 minutos en NaCl 40%, se lavó dos veces con agua destilada, luego a ambas especies se les agregó 500 µl de buffer de extracción (Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol 0.08%, glicerol 50%, agua destilada), 70 µl de polivinil polypirrolidona (PVPP) al 4% y una puntita de arena. Se centrifugaron una vez, a 10 000 rpm por 4 minutos a 21 °C. Se sacó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a 2000 rpm, durante 2 minutos a 21 °C, luego el sobrenadante se guardó en un refrigerador a -21 °C hasta su utilización.

Preparación del gel: Se realizaron electroforesis discontinuas, en gel de poliacrilamida (PAGE), tanto nativa como desnaturalizante con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel separador se probó en concentraciones del 8 y 10%, el espaciador solamente al 4% según el protocolo de Laemmli, 1970, la solución se preparó en beakers de 25 ml en un agitador magnético, se calentó a 3 °C y se agitó a 7 rpm.

Corrida electroforética: Se utilizó el marcador de peso molecular SDS 6H de Sigma, del cual se colocaron 5 µl en el gel. Se tomó 60 µl de muestra de *L. aequinoctialis* y 40 µl de *L. valdiviana*; a ambas muestras se les agregó 4 µl de azul de bromofenol 0.05%, 4 µl de buffer tanque (Tris-HCl 1X, pH 8.3) y 4 µl de glicerol al 80%. El miliamperaje fue de 4 a 5 mA y el tiempo de corrida varió de 3 a 5 horas.

Tinción del gel: Se sacó el gel y se tiñó con azul commassie R-250 por 12 horas. Visualizadas las proteínas se decoloró con una solución de ácido acético al 7% y metanol al 5% durante 12 horas.

Análisis estadístico: La similitud genética entre las dos especies fue estimada por medio del Índice de Jaccard incluido en el paquete estadístico Biodiversity Pro, versión 2 (Biodiversity Pro, 1997 NtM & SAMS, Pielou, 1984), Londres, UK.

RESULTADOS

Para el caso de *L. aequinoctialis*, la electroforesis con SDS, en gel separador al 10%, presentó dos bandas, la primera con un ámbito de peso molecular superior a los 205,000 kDa según el marcador, la segunda entre 45,000 kDa-29,000 kDa. Por otra parte, para *L. valdiviana* se obtuvo sólo una proteína en un ámbito de más de 205,000 kDa como en el caso de *L. aequinoctialis* (Figura 1).

La corrida electroforética en el gel separador al 8% (Figura 2) mostró dos bandas en *L. aequinoctialis,* ambas con un alto peso molecular, mayor que el marcador. *Lemna valdiviana* no presentó bandas. Por otro lado, en la electroforesis nativa se obtuvieron resultados con *L. valdiviana* (Figura 3). En el gel separador al 8% se mostraron cuatro bandas, las bandas uno y dos con peso molecular

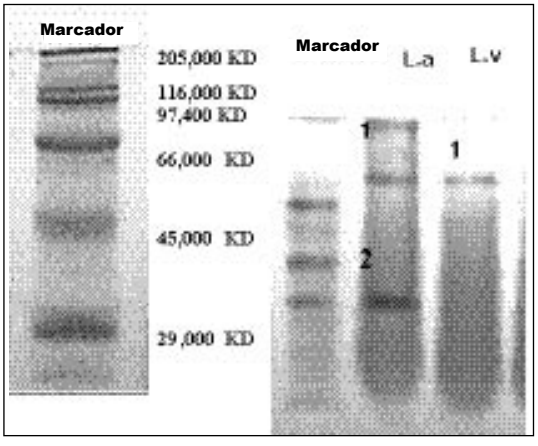

Figura 1. Izquierda: Marcador de peso molecular (SDS-6H). Derecha: Aparición de dos patrones electroforéticos en *Lemna aequinoctiales* (L.a.). Aparición de una banda en *Lemna valdiviana* (L.v.). Gel espaciador (superior) 4%, gel separador (inferior) 10%, miliamperaje 4 mA, tiempo de corrida: 4 horas.

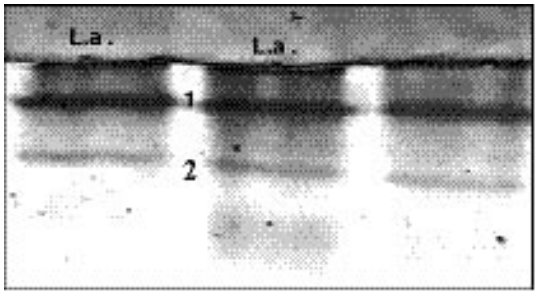

Figura 2. Aparición de patrones electroforéticos en *Lemna aequinoctialis* (L.a). Gel espaciador (superior) 4%, gel separador (inferior) 8%, miliamperaje 4 mA, tiempo de corrida: 3 horas.

entre 205,000 kDa-116,000 kDa. Las bandas tres y cuatro con un ámbito de 116,000 kDa-97,400 kDa. La movilidad electroforética relativa (Rf) varió según el porcentaje de gel separador (Cuadro 1) y solamente en el gel al 10% una banda presentó la misma movilidad, tanto para *L. valdiviana* como para *L. aequinoctialis* (Cuadro 1 B, D).

Por otra parte, el porcentaje de similitud entre estas dos especies fue del 12.5%. Este valor se obtuvo a partir de las distancias electroforéticas relativas (Rf) que mostraron las diferentes bandas de proteínas (Cuadro 1).

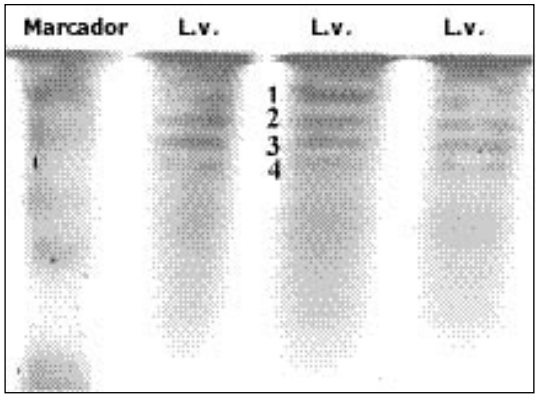

Figura 3. Aparición de cuatro patrones electroforéticos en *Lemna valdiviana* (L.v.). Gel espaciador (superior) 4%, gel separador 8%, miliamperaje 5 mA, tiempo de corrida: 7 horas.

Cuadro 1. Rf (movilidad electroforética relativa). Patrón de bandas de proteínas totales. A. *Lemna valdiviana* (gel separador 8%). B. *Lemna valdiviana* (gel separador 10%). C. *Lemna aequinoctialis* (gel separador 8%). D. *Lemna aequinoctialis* (gel separador 10%).

Rf (mm)	A. *L.v.*	B. *L.v.*	C. *L.a.*	D. *L.a.*
0.0270				
0.0810				
0.138				
0.1621				
0.1891				
0.222				
0.2571				
0.742				

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las diferencias encontradas en la cantidad de bandas de proteína para las dos especies de *Lemna*, y el bajo porcentaje de similitud encontrado entre ambas, representan la diferencia que en el nivel genético-molecular separa a estas plantas en dos especies diferentes. El origen de las diferencias puede ser diverso. Por un lado, la distribución espacial en Costa Rica, de *Lemna valdiviana* y *Lemna aequinoctialis* es muy diferente. Las presiones de selección varían en las diversas localidades, originando cambios en las respuestas adaptativas y, por lo tanto, la variación molecular (Santamaría, 2002). Otro factor que puede influenciar la variación molecular es el tipo de reproducción. *Lemna aequinoctialis* se muestra como una especie fértil en Costa Rica, por lo tanto, su reproducción es sexual, por lo que se esperaría mayor variación, mientras que *Lemna valdiviana* es estéril, su reproducción es vegetativa (Grayum, 1986). Sin embargo, esta última fue la que presentó mayor variación (presencia de más patrones proteicos). Algunos autores han encontrado que la diversidad genética no se ve afectada por la ausencia de reproducción de tipo sexual, esto se observó en otros casos de especies estériles, como *Lemna minor*, que mostró mayor variación genética que *Lemna aequinoctialis*, que no presentó variación genética significativa a pesar de reproducirse sexualmente (Santamaría, 2002).

La presente investigación aporta información para los estudios filogenéticos de estas dos especies, ya que las contribuciones en este campo son escasas, y en el nivel morfológico es difícil establecer una relación clara entre ellas, debido a sus escasas diferencias físicas y dificultad para encontrarlas (Les et al., 2002).

Finalmente, la técnica de separación electroforética (NATIVO y SDS-PAGE) es una herramienta básica y útil para una valoración general en las etapas de caracterización molecular y es de amplia sensibilidad (Rybick and Maud, 2005). En estas dos especies aún quedan muchos estudios por realizar en el campo de la genética.

BIBLIOGRAFÍA

Bengtsson, B., Bongo, J. and Eklund, B. 1999. "Assessment of Duckweed *Lemna aequinoctialis* as a Toxicological Bioassay for Tropical Environments in Developing Countries". *Ambio*. 28 (2): 152-155.

Davy, M., Petrie, R., Smrchek, J., Kuchnicki, T. and Francois, D. 2003. *Proposal to update non-target plant toxicity testing under nafta Canada*. USEPA Scientific Advisory Panel Briefing.

El-Shafai, S., El-Gohary, F., Johan, A., Verte, J., Schrama, J. and Huub, G. 2004. "Apparent digestibility coefficient of duckweed (*Lemna minor*), fresh and dry for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)". *Aquaculture Research*. 35 (6): 574.

Grayum, M. "Lemnaceae" (en línea). *Inbio*. 1986. Volumen 1-2. <http://www.inbio.ac.cr/papers/manual_plantas/Textosrevisados/Lemnabor.htm> [consulta: 16 de mayo del 2005].

Landesman, L., Parker, N., Fedler, B. and Konikoff, M. 2005. "Modeling duckweed growth in wastewater treatment systems". *Livestock Research for Rural Development*. 17 (6).

Leng, R., Stambolie, J. and Bell, R. 1995. "Duckweed-a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish". *Livestock Research for Rural Development*. 7 (1).

Les, D., Crawford, J., Landolt, E., Gabel, D. and Kimball, T.

2002. "Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family". *Systematic Botany*. 27 (2): 221-240.

Rybick, E. and Maud, P. "SDS poliacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)" (en línea). *The American Electrophoresis Society 21*. <http://www.sds polyacrylamide gel electrophoresis sds-page american electrophoresis society 21.htm> [consulta: 22 de diciembre del 2005].

Sanabria de A., N., Guadarrama, A. y Romero, H. 2002. "Caracterización de especies de Fusarium mediante patrones electroforéticos de proteínas". *Rev. Fac. Agron*. 28: 161-173.

Santamaría, L. 2002. "Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneityin a stressful environment". *Acta Oecológica*. 23: 137-154.

Thi Kim Khang, N. and Ogle, B. 2004. "Effects of dietary protein level and duckweed supplement on the growth rate of local breed chicks". *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 16, Art. #54. Retrieved May 29, 2006, from http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/8/khan16054.htm