

Evaluación preliminar del patrón electroforético en una dimensión (SDS-page) de proteínas de semilla en especies del género *Passiflora* L. *Passifloraceae*

Preliminary evaluation of seed electrophoresis protein in one dimension (SDS-page) in species of genus *Passiflora* L. *Passifloraceae*

S. Perez-Cortez¹, M. Escala² y S. Tillett³

¹Dirección actual: Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Jardín Botánico de Caracas, Av. Salvador Allende, Universidad Central de Venezuela. Apartado 2156: Caracas 1010-A, Venezuela.

²Centro de Botánica Tropical. Universidad Central de Venezuela. Apartado 20513: Caracas-Venezuela.

³Herbario Dr. Víctor M. Ovalles. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Apartado 40109: Caracas-Venezuela.

Resumen

Se estudio el patrón de proteínas de semilla en 24 especies del género *Passiflora* L. a fin de buscar características que permitan distinguir especies y contribuyan a resolver problemas taxonómicos presentes en el género. Se realizó la extracción de proteínas totales solubles del macerado de 2 o 3 semillas por especie en TRIS 0.5 M pH 6.8, NaCl 0.3 M, SDS 0.1%, β -MeETOH 0.2%. Se efectuó electroforereresis unidimensional en un minigel de 8 x 7,3 mL con acrilamida 14%, TRIS 0.5 M pH 8.8, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMET 1% como separador y con acrilamida 5%, TRIS 0.39, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMET 1%.6.8 como concentrador. Se uso como amortiguador de corrida TRIS 0.024 M, 0.19 M glicina, SDS 0.1%. Se encontraron dos bandas (32 y 14 kDa) comunes a todas las especies y otras bandas presentes sólo en algunas especies. El patrón unidimensional de proteínas de semilla en las especies estudiadas del género *Passiflora* es una herramienta potencial para caracterizar especies y complementar estudios taxonómicos y sistemáticos del grupo.

Palabras clave: Semilla, *Passiflora*, proteina, Passifloraceae, SDS-page.

Recibido el 9-1-2007 • Aceptado el 30-4-2007

Autor para correspondencia e-mail: perezsi@rect.ucv.ve; mescala@reacciun.ve; tilletts@camelot.rect.ucv.ve

Abstract

The electrophoretic pattern of seed proteins of 24 species of *Passiflora* L. genus was studied in order to search for characteristic that would allow species distinction and resolve taxonomic problems. The extraction of total protein soluble was done TRIS 0.5 M pH 6.8, NaCl 0.3 M, SDS 0.1%, β -MeETOH 0.2% With 2 or 3 seed to species. The electrophoretic protein in one dimension was done in minigel (8 x 7.3 ml) with acrylamida 14%, TRIS 0.5 M pH 8.8, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMET 1% for running and acrylamida 5%, TRIS 0.39, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMET 1%.6.8 for starting. The buffer of running was TRIS 0.024 M, 0.19 M glycin, SDS 0.1%. In all species two bands (32 y 14 KDa) was founded and bands presents only in some species. The seed electrophoresis protein in one dimension let characterizer some species and help in taxonomic and systematic studies on *Passiflora* genus.

Key words: Seed, *Passiflora*, protein, Passifloraceae, SDS-page.

Introducción

Los patrones de proteínas de semillas o de polen son útiles para análisis a nivel de población, especie, subespecie y de género (8). En especies del género *Passiflora* los análisis bioquímicos realizados han permitido aislar e identificar varios de los compuestos presentes en el grupo (2). Esta información se ha utilizado para desarrollar objetivos: taxonómicos (quimiotaxonomía), de aplicación (médica, alimentaria, industrial) y de aislamiento e identificación de compuestos (2, 6). El género *Passiflora* está constituido por aproximadamente 500 especies distribuidas tanto el Viejo como el nuevo Mundo. El género *Passiflora* está dividido en 22 subgéneros y algunos están subdivi-

dados en secciones y series (7). Estudios de diversidad genética en *Passiflora* han evidenciado un alto nivel de polimorfismo entre especies y dentro de estas (4). En el género *Passiflora* la estructura floral en las especies de es compleja, hay alto grado de polimorfismo foliar, incluso dentro de un mismo individuo, esto ha generado abundante sinonimia y confusión en la identificación de especies (7, 9). En este sentido, la presente investigación tiene como objetivo determinar el patrón de proteínas de semilla en especies del género *Passiflora* y proporcionar una herramienta potencial para estudios taxonómicos para el grupo.

Material y métodos

Se realizó la extracción de proteínas totales solubles del macerado de 2 o 3 semillas por especie (*P. alata*,

P. auriculata, *P. biflora*, *P. bryonioides*, *P. candollei*, *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. coccinea*,

P. coriacea, *P. costata*, *P. cuneata*, *P. edulis*, *P. foetida*, *P. garckeii*, *P. gracilis*, *P. gritensis*, *P. guazumeafolia*, *P. hannii*, *P. holosericea*, *P. laurifolia*, *P. lindeniana*, *P. ligularis*, *P. manicata*, *P. mansii*) en 200 µl de TRIS 0.5 M pH 6.8, NaCl 0.3 M, SDS 0.1%, β-MeETOH 0.2% (amortiguador de extracción). Se agitó continuamente en baño de hielo (2-4°C), luego se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min. Se cuantificó la concentración de proteínas extraídas (1). Se precipitaron las proteínas con acetona fría (-20°C). Posteriormente se dejó en el congelador a -40°C durante 1 h. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. a temperatura de 2-4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las proteínas en TRIS 0.12 M pH 6.8, glicerol 20%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,0001%, β-MeETOH 25%. Se agitó en vórtex y se desnaturalizaron las proteínas calentando en baño de agua (90-100°C) durante 5 min. La electroforesis unidimensional se realizó en un minigel de 8 x 7,3 ml con acrilamida 14%, TRIS 0.5 M pH 8.8, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMET 1% como

separador y con acrilamida 5%, TRIS 0.39, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMET 1%.6.8 como concentrador. Se uso como amortiguador de corrida TRIS 0.024 M, 0.19 M glicina, SDS 0.1%. Se depositó una alicata de 10 µl de la muestra (20 µg/µl) en cada bolsillo del gel; en un extremo se colocó el patrón de pesos moleculares (miosina 202 kDa, β-galactosidasa 116 kDa, albumina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa, tripsina 20.1 kDa, Û-lactoalbumina 14.2 kDa y aprotinina 6.5 kDa) elaborado por SIGMA para estimar el peso molecular de las proteínas en estudio. Se corrió a 60 voltios en el gel concentrador y 100 voltios en el separador. Se coloreó el gel con una solución de azul Coomassie (0,25% Coomassie Brilliant Blue, 50% etanol, 10% ácido acético) durante 1 h. Se lavó el exceso de colorante con solución de 25% metanol, 7% ácido acético, 68% H2O mL. Se secó el gel por 10 min a 20°C y se guardó en papel celofán a temperatura ambiente. Se compararon los patrones de bandas proteicas entre las especies estudiadas y realizó un análisis de agrupamiento.

Resultados y discusión

El análisis del patrón electroforético unidimensional proteína totales solubles de semilla para 24 especies del género *Passiflora* (cuadro 1, figura 1) reveló la presencia de un par de bandas de 32 y 14 kilodaltons (kDa) comunes a todas las especies estudiadas, éstas indican homogeneidad del grupo y quizás podrían ser

características del género, para verificar esto es necesario ampliar el número de especies estudiadas y analizar especies de otros géneros de la familia Passifloraceae y de otras familias relacionadas. También se observó un duplete de bandas de 60 y 58 kDa en 13 de las 24 especies estudiadas y cercano a éstas hay una ban-

Cuadro 2. Características del patrón de proteínas totales solubles de semilla para especies del género *Passiflora*. kDa (kilodaltons), PM (peso molecular), valores en negrita = bandas comunes a todas las especies, banda presente (+), banda ausente (-), banda no resuelta (0), una sola banda(1/2).

Especie	Cantidad de bandas	PM en kDa	Duplete	Banda debajo del duplete	Banda de 10 kDa
<i>P. alata</i>	4	60, 58, 32,14	+	0	0
<i>P. auriculata</i>	2	32, 14	-	-	0
<i>P. biflora</i>	4	60, 58, 32, 14	+	-	0
<i>P. bryonioides</i>	4	60, 58, 32, 14	+	-	-
<i>P. candollei</i>	2	32, 14	-	-	0
<i>P. capsularis</i>	3	58, 32, 14	1/2	-	0
<i>P. cincinnata</i>	5	60, 58, 51, 32, 14	+	+	-
<i>P. coccinea</i>	2	32, 14	-	-	0
<i>P. coriacea</i>	5	116, 60, 58, 32, 14	+	0	0
<i>P. costata</i>	2	116, 60, 58, 32, 14	0	-	0
<i>P. cuneata</i>	2	32, 14	-	0	0
<i>P. edulis</i>	6	60, 58, 51, 32, 14,10	+	+	+
<i>P. foetida</i>	5	60, 58, 32, 14, 9	+	-	+
<i>P. garckeii</i>	2	32, 14	-	-	0
<i>P. gracilis</i>	4	60, 58, 32, 14	+	-	-
<i>P. gritensis</i>	5	116, 60, 58, 32,14	+	0	-
<i>P. guazumeafolia</i>	4	58, 40, 32, 14	+	0	0
<i>P. hannii</i>	3	58, 32, 14	1/2	-	0
<i>P. holosericea</i>	5	116, 60, 58, 32, 14	+	-	0
<i>P. laurifolia</i>	5	60, 58, 32, 14, 10	+	-	+
<i>P. lindeniana</i>	2	32,14	0	-	0
<i>P. ligularis</i>	4	58, 51, 32, 14,	+	-	0
<i>P. manicata</i>	6	166, 60, 58, 32,14, 10	+	0	+
<i>P. mansii</i>	2	32,14	0	-	0

da de 51 kDa únicamente en *P. edulis*, *P. cincinnata* y *P. ligularis*. Las especies *P. edulis*, *P. laurifolia*, y *P. foetida* que de pertenecen al subgénero *Passiflora* (7) presentaron una banda de aproximadamente 10 kDa: Sin embargo, cabe destacar que esta banda también se observó en *P. manicata* que pertenece al subgénero

Granadillastrum. La caracterización de especies del género *Passiflora* según el patrón de bandas proteicas de la semilla tuvo limitaciones metodológicas para lograr la concentración adecuada de proteínas a cargar en el gel. Es posible que en las condiciones de trabajo (precipitación con acetona, semillas no

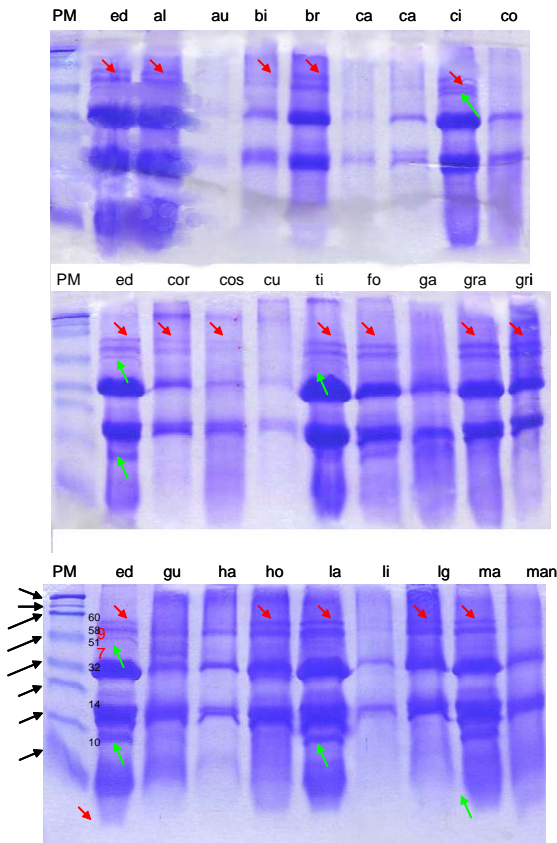


Figura 1. Patrón de proteínas totales solubles de semilla para 24 especies del género *Pasiflora*. (PM) marcador de proteínas y su peso molecular, (ed) patrón de proteínas de *P. edulis* y su peso molecular estimado, (al) *P. alata*, (au) *P. auriculata*, (bi) *P. biflora*, (br) *P. bryonioides*, (ca) *P. candollei*, (cap) *P. capsularis*, (ci) *P. cincinnata*, (co) *P. coccinea* (cor) *P. coriacea*, (cos) *P. costata*, (cu) *P. cuneata*, (ti) *P. aff. tiliaefolia*, (fo) *P. foetida*, (ga) *P. garckeii*, (gra) *P. gracilis*, (gri) *P. gritensis*, (gu) *P. guazumaefolia*, (ha) *P. hannii*, (ho) *P. holosericea*, (la) *P. laurifolia*, (li) *P. lindeniana*, (lg) *P. ligularis*, (ma) *P. manicata*, (man) *P. mansii*. (↘) Duplete de bandas presente en casi todas las especies. (↗) Banda presente en algunas especies.

deslipidizadas) exista la presencia de otras sustancias en el extracto de semillas. Otro factor que afecta la in-

terpretación del patrón de bandas es la gran cantidad de proteínas presentes en los extractos de semilla, que

impide una buena separación de las bandas. La disminución de la concentración de proteína cargada en el gel no mejora la resolución ya que muchas bandas desaparecen. Cabe señalar que las muestras utilizadas en esta investigación son semillas provenientes de herbario, condición que reduce considerablemente la concentración de proteínas en la semilla (5). La resolución de bandas también es afectada por una coloración de fondo en los geles; la causa de esta coloración se desconoce, pero es posible que se deba a la presencia de lípidos, los cuales podrían haberse removido con los solventes orgánicos utilizados (5). Esta idea es apoyada por la literatura donde se indica que la semilla en las especies del género *Passiflora* tiene abundantes aceites (3). A pesar de las limitaciones encontradas para la obtención e interpretación del patrón de bandas proteicas, se observa variación en dicho patrón entre las especies estudiadas. El análisis de agru-

pamiento (figura 2) realizado separa las especies estudiadas en dos grupos: A.- formado por 19 especies distribuidas en tres subgrupos (A_1 , A_2 , A_3) que coinciden ampliamente con la clasificación de Killip (7) y B.- formado por especies poco relacionadas (*P. manicata*, *P. holosericea*, *P. gritensis*, *P. costata* y *P. coriacea*). El grupo A_1 relaciona 3 especies cercanas (7): *P. biflora*, *P. bryonioides*, *P. gracillis* (subgénero *Plectostemma*) y *P. alata* (*Passiflora*). Luego separa a *P. cincinnata*, *P. laurifolia*, *P. edulis* y *P. foetida* (subgénero *Passiflora*). El grupo A_2 contiene 7 especies, 4 ubicadas en el subgénero *Plectostemma* sección *Cieca* (*P. auriculata*, *P. cuneata*, *P. coccinea* y *P. candollei*), 2 en el subgénero *Astrophea* (*P. Lindeniana*, *P. mansii*) y *P. garckeii* en *Passiflora*. El grupo A_3 está formado por 4 especies: *P. hannii* y *P. capsularis* muy relacionadas (subgénero *Plectostemma*, sección *Decaloba*), *P. guazumeafolia* y

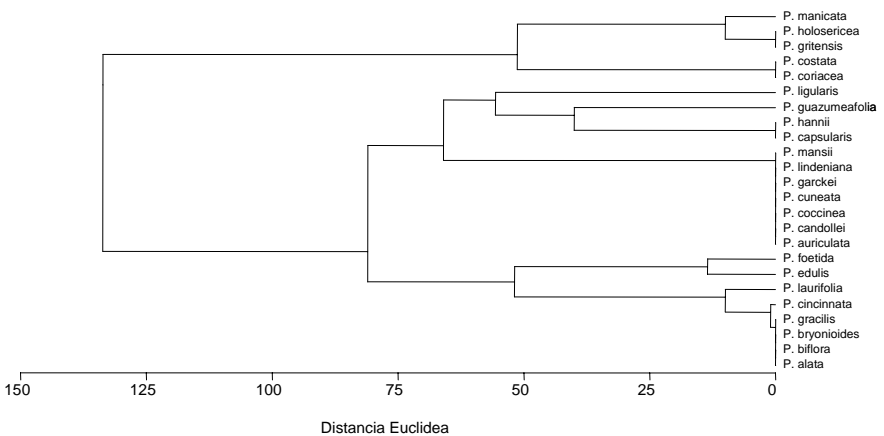


Figura 2. Análisis de agrupamiento

P. ligularis del subgénero *Passiflora* serie *Laurifoliae* y *Quadrangularis*, respectivamente. El dendrograma obtenido de acuerdo con el patrón de

proteínas solubles de semilla muestra amplia coincidencia con la clasificación de Killip 1938.

Conclusiones

La presencia de bandas de 32 y 14 kDa a todas las especies estudiadas revela homogeneidad del género. La interpretación del patrón de bandas proteicas refleja variación entre las especies estudiadas. El dendrograma obtenido de acuerdo con el patrón de proteínas solubles de semilla muestra amplia coincidencia

con la clasificación de Killip 1938. El patrón unidimensional de proteínas totales solubles de semilla en las especies estudiadas del género *Passiflora* es una herramienta potencial para caracterizar especies y complementar estudios taxonómicos y sistemáticos del grupo.

Literatura citada

1. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
2. Carabot, A., J. Carmona, P. Melendez, A. Cegarra, J.M. Amaro y J.M. Jimenez. 2000. Listado florístico de plantas con actividad biológica del Amazonas venezolano. *Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes* 39: 5-12.
3. Corner, E.J.H. 1976. The seeds of Dicotyledons. Vol. I y Vol. II Cambridge University Press. 861 pp.
4. Crochemore, M. L., Molinari, H. B. Correa y Vieira, L. G. Esteves. 2003. Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46(4):521-527.
5. Estrada, E.B., L. Scheinvar, A. Alagón y G. Olalde-Parra. 2000. Resultados preliminares de electroforesis de proteínas como método auxiliar en la taxonomía de *Opuntia* spp. *Acta. Cient. Potos.* 15(1): 7-24.
6. Howard, R.A. 1994. Eighteenth century West Indian pharmaceuticals. *Harvard Papers in Botany* 5: 69-91.
7. Killip, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. *Field Mus. Nat. Hist.; Bot. Ser.* XIX (1 y 2): 1-613.
8. Stace, C.A. 1989. *Plant taxonomy and biosystematics*. Second edition. Chapman and Hill Inc. 264 pp.
9. Tillett, S.S. 1988. *Passionis passifloris* II. Terminología. *Ernstia* 48: 1-40.