

CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE NUEVE VARIEDADES BOTÁNICAS DE *Tigridia pavonia* (L. f.) DC

ISOZYME CHARACTERIZATION OF NINE BOTANICAL VARIETIES OF *Tigridia pavonia* (L. f.) DC

Amaury M. Arzate-Fernández*, Alejandra Hoyos-Basurto, Luis M. Vázquez-García y Ma. de Guadalupe Gutiérrez-Martínez

Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca. Km 11.5. entronque al Cerrillo. Centro Universitario "El Cerrillo". 50200. Toluca, México. (amaury1963@yahoo.com.mx)

RESUMEN

Se estudiaron los patrones de bandedo isoenzimáticos (PBI) de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L. f.) DC., especie nativa de México con un alto potencial ornamental. Las variedades fueron recolectadas en tres municipios del Estado de México: Tenancingo (2100 m), Temascaltepec (2250 m) y Temoaya (2600 m). Como fuente de extracción de proteínas se usaron tejidos foliares de cada variedad. En los corrimientos se empleó la técnica de electroforesis horizontal en geles de almidón (SGE). Con SGE fueron ensayadas nueve isoenzimas: aspartato amino transferasa (AAT; EC 2.6.1.1), fosfatasa ácida (ACP; EC 13.1.3.2), catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD; EC 1.1.1.44), fosfogluco isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9), fosfoglucomutasa (PGM; EC 2.7.5.1), fosfohexosa isomerasa (PHI; EC 5.3.1.8) y peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7). Se observaron 32 bandas arregladas en 20 PBI: dos para AAT, dos para ACP, dos para CAT, cuatro para MDH, uno para PGD, uno para POX, tres para PGI, tres para PHI y dos para PGM. La isoenzima más polimórfica fue MDH, mientras que PGD y POX no mostraron polimorfismo. Los datos de siete isoenzimas fueron usados para calcular las relaciones genéticas con el método UPGMA. Las variedades de *T. pavonia* pudieron ser diferenciadas una de otra, excepto las variedades Ángeles de Sandra y Carolina de Dulce, las cuales no pudieron distinguirse con los PBI observados. Las variedades Gloria y Samaria, recolectadas a 2600 m, presentaron mayor variación genética que las recolectadas a 2100 o 2250 m, lo cual podría atribuirse a la altitud. Se concluye que las isoenzimas pueden usarse para la diferenciación genética de variedades de *T. pavonia*.

Palabras clave: *Tigridia pavonia*, electroforesis en gel de almidón, caracterización varietal, isoenzima, marcadores bioquímicos.

ABSTRACT

Isozyme banding patterns (IBP) were studied in nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L. f.) DC., a native species of México that is highly promising as an ornamental. The varieties were collected in three high-altitude municipalities of the state of México. Tenancingo (2100 m), Temascaltepec (2250 m), and Temoaya (2600 m). Leaf tissues of each variety were used as the source for protein extraction. The horizontal starch gel electrophoresis (SGE) technique was used in the runs. With SGE, nine isozymes were tested: aspartate aminotransferase (AAT; EC 2.6.1.1), acid phosphatase (ACP; EC 13.1.3.2), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37), 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD; EC 1.1.1.44), phosphoglucose isomerase (PGI; EC 5.3.1.9), phosphoglucomutase (PGM; EC 2.7.5.1), phosphohexose isomerase (PHI; EC 5.3.1.8) and peroxidase (POX; EC 1.11.1.7). Thirty-two bands were observed arranged in 20 IBP: two for AAT, two for ACP, two for CAT, four for MDH, one for PGD, one for POX, three for PGI, three for PHI, and two for PGM. The most polymorphic isozyme was MDH, while PGD and POX did not exhibit polymorphism. The data of seven isozymes were used to calculate genetic relationships with the UPGMA method. *T. pavonia* varieties could be differentiated from each other, except for the varieties Angeles de Sandra and Carolina de Dulce, which could not be distinguished with the observed IBP. The varieties Gloria and Samaria, collected at 2600 m, had greater genetic variation than those collected at 2100 or 2250 m, possibly attributable to altitude. It is concluded that isozymes can be used to genetically differentiate varieties of *T. pavonia*.

Key words: *Tigridia pavonia*, starch gel electrophoresis, varietal characterization, isozymes, biochemical markers.

INTRODUCTION

Oceloxochitl, or tiger flower, *Tigridia pavonia* (L.f.) DC., is a bulbous plant native to México, very abundant in the country, mainly in *Pinus* and *Quercus* forests. Because of this extensive distribution, México is considered its center of greatest

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.
Recibido: Septiembre, 2007. Aprobado: Mayo, 2008.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 519-528. 2008.

INTRODUCCIÓN

La flor del tigre u Oceloxochitl, *Tigridia pavonia* (L. f.) DC., es una planta bulbosa nativa de México muy abundante en el país, principalmente en bosques de *Pinus* y *Quercus*. Debido a esta extensa distribución, México es considerado su centro de mayor diversidad genética. Por su belleza natural se encuentra en jardines familiares, parques, panteones, y en forma silvestre (Vázquez-García *et al.*, 2001a, 2001b; Vázquez-García y López-Sandoval, 2003).

En México no hay registros de su producción comercial, pero en Europa, Asia y Australia aparece en catálogos de horticultura como planta para jardinería. Así, se extraen plantas silvestres en México, exponiendo el acervo fitogenético a una descontrolada y peligrosa erosión genética (Vázquez-García *et al.*, 2001b).

En el país, la variabilidad fitogenética es necesaria para mantener y mejorar la agricultura, pero se requiere conocerla para su uso y conservación. Por ello, es importante la caracterización morfológica y molecular de variedades. Al respecto, Vázquez-García *et al.* (2001a) describieron botánicamente nueve variedades de *T. pavonia* siguiendo el patrón de 17 descriptores. Sin embargo, muchas de las diferencias morfológicas pueden ser alteradas por el ambiente, pero su información genética no cambia, por lo cual se aplican técnicas para identificar variedades usando marcadores genéticos. Pero la literatura sobre marcadores genéticos es muy limitada para el género *Tigridia*.

Rodríguez y Sytsma (2005) estudiaron la relación filogenética entre 23 especies de la tribu Tigridieae (Iridaceae) usando datos morfológicos y secuenciación de nucleótidos con marcadores ITS (Internal Transcribed Spacer). Aunque los marcadores bioquímicos como isoenzimas son una técnica práctica y reproducible, no han sido reportados para la flor del tigre. Estos marcadores son codominantes (Kephart, 1990), no muestran efectos ambientales (Marquard y Chan, 1995; Booy *et al.*, 1998) y por tanto son apropiados para estimar parámetros poblacionales y construir mapas genéticos. Además de confiables, son relativamente más económicos que aquellos de tipo molecular y permiten obtener información con diferentes tejidos (Vicente y Fulton, 2003). Las isoenzimas han sido reportadas exitosamente en varias especies vegetales: frijol, *Phaseolus vulgaris* L. (Bassiri y Adams, 1977); arroz, *Oryza sativa* (Tso y Chen, 1997); tulipán, *Tulipa* spp. (Booy y Van Raamsdonk, 1998); henequén, *Agave fourcroydes* (Colunga-Garciamarin *et al.*, 1999); fresa, *Fragaria x ananassa* (Gálvez *et al.*, 2001); lilies, *Lilium* spp. (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a).

Algunas variedades de *T. pavonia* son diploides ($2n=26, 28$) y requieren más de dos años, desde la

genética diversidad. Aunque it grows wild, because of its natural beauty, it is also found in family gardens, parks, and cemeteries (Vázquez-García *et al.*, 2001a, 2001b; Vázquez-García and López-Sandoval, 2003).

In México there is no record of its commercial production, but in Europe, Asia and Australia it is included in horticultural catalogs as a garden plant. Thus, wild plants are extracted, and México's phylogenetic germplasm is exposed to dangerous uncontrolled genetic erosion (Vázquez-García *et al.*, 2001b).

In México, the phylogenetic variability needed for maintenance and improvement of agriculture is abundant, but knowledge of this variability is necessary to conserve it and to use it in breeding programs. Morphological and molecular characterization of varieties is therefore desirable. In this respect, Vázquez-García *et al.* (2001a) described nine varieties of *T. pavonia* botanically, following a pattern of 17 descriptors. Many of the morphological differences, however, may be altered by the environment, but its genetic information does not change. Thus, techniques using genetic markers are applied to identify varieties, but literature on genetic markers for the genus *Tigridia* is very limited.

Rodríguez and Sytsma (2005) studied the phylogenetic relationship among 23 species of the tribe Tigridieae (Iridaceae) using morphological data and nucleotide sequencing with ITS (Internal Transcribed Spacer) markers. Although biochemical markers, such as isozymes, are a practical, reproducible technique, none have been reported for the tiger flower. These markers are co-dominant (Kephart, 1990) and do not exhibit environmental effects (Marquard and Chan, 1995; Booy *et al.*, 1998) and therefore, are able to evaluate population parameters and to build genetic maps. Besides being reliable, they are relatively cheaper than those of the molecular type and allow access to information with different tissues (Vicente and Fulton, 2003). Isozymes have been successfully reported in several plant species: beans, *Phaseolus vulgaris* L. (Bassiri and Adams, 1977); rice, *Oryza sativa* (Tso and Chen, 1997); tulips, *Tulipa* spp. (Booy and Van Raamsdonk, 1998); henequen, *Agave fourcroydes* (Colunga-Garciamarin *et al.*, 1999); strawberries, *Fragaria x ananassa* (Gálvez *et al.*, 2001); lilies, *Lilium* spp. (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a).

Because some varieties of *T. pavonia* are diploids ($2n=26, 28$) and require more than two years from sowing to flowering, they are propagated vegetatively (Molseed, 1970). In this way, collected materials can be kept as clones and, being free-pollinating, their genome structure can be considered heterozygotic.

In spite of the economic importance of this species and the transcendence of varietal identification, no

siembra hasta la floración, para ser propagadas vegetativamente (Molseed, 1970). Así, los materiales recolectados pueden ser mantenidos como clones y por ser de polinización libre, su estructura genómica puede considerarse como heterocigótica.

A pesar de la importancia económica de la especie y la trascendencia de la identidad varietal, no se encontraron estudios de su caracterización isoenzimática. Por tanto, los objetivos de esta investigación fueron: 1) caracterizar molecularmente nueve variedades botánicas de *T. pavonia* usando nueve sistemas isoenzimáticos, aplicando la técnica de electroforesis horizontal sobre geles de almidón; 2) analizar la posible relación entre la altitud de muestreo y el valor de la diferenciación genética de las variedades evaluadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo

Se usaron nueve variedades botánicas de *T. pavonia* (L. f.) DC., recolectadas en tres localidades del Estado de México: la variedad Sandra (SAN) en el municipio de Tenancingo (2100 m); las variedades Ángeles (ANG), Dulce (DUL), Penélope (PEN), Mariana (MAR), Carolina (CAR) y Trinidad (TRI) en el municipio de Temascaltepec (2250 m); las variedades Samaria (SAM) y Gloria (GLO), en el municipio de Temoaya (2600 m). Las nueve variedades fueron cultivadas a 18 °C y HR 60%, en un sustrato de tierra de monte, arena y estiércol vacuno (1:1:1), en un invernadero rústico de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, (UAEM) situada a 2600 m.

Se usaron dos individuos de cada variedad de *T. pavonia*. Se tomaron secciones de hoja de cada individuo, entre las ocho y las 12 semanas después de iniciada la brotación. Todas las muestras se procesaron en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM.

Procedimiento electroforético

Aproximadamente 50 mg de tejido foliar fresco de cada muestra fue homogeneizado usando una barreta de plástico en 50 µL de solución amortiguadora extractora de Tris-HCl (hidroximetil aminometano) 0.1M, EDTA-2Na (etilen diamino tetracético) 2%, glicerol 50.4%, tween-80 3.2% y DTT (ditiotretol) 0.8%, pH 7.5 (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a). Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Se usaron dos sistemas amortiguadores de histidina-ácido cítrico, pH 5.7 y pH 6.5 (H-AC) y Tris-citrato/Tris-histidina, pH 8.5 (T-C/T-H), según los procedimientos de Glaszmann *et al.* (1988) y Stuber *et al.* (1988). Los 18 sistemas isoenzimáticos evaluados fueron: aspartato amino transferasa (AAT; EC 2.6.1.1), fosfatasa ácida (ACP; EC 13.1.3.2), alcohol deshidrogenasa (ADH; EC 1.1.1.1), aminopeptidasa (AMP; EC 3.4.11.1), catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), endopeptidasa (ENP; EC 3.4.23.6), esterasa (EST; EC 3.1.1.1), formato deshidrogenasa (FDH; EC 1.2.1.2), glutamato

studies were found about its isozyme characterization. Therefore, the objectives of this study were 1) to characterize molecularly nine botanical varieties of *T. pavonia* using nine isozyme systems with the horizontal starch gel electrophoresis technique; 2) to analyze the possible relationship between sampling altitude and the value of genetic differentiation of the evaluated varieties.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Nine botanical varieties of *T. pavonia* (L.f.) DC. were collected at different altitudes in three localities of the State of México: Sandra (SAN), in Tenancingo (2100 m); Ángeles (ANG), Dulce (DUL), Penelope (PEN), Mariana (MAR), Carolina (CAR) and Trinidad (TRI), in the municipality of Temascaltepec (2250 m); and Samaria (SAM) and Gloria (GLO), in Temoaya (2600 m). The nine varieties were cultivated at 18 °C and 60% RH in a substrate of forest litter, sand and cow manure (1:1:1) in a rustic greenhouse at the Facultad de Ciencias Agrícolas of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) located at 2600 m.

Two individuals of each *T. pavonia* variety were used. Leaf sections were taken from each individual eight to 12 weeks after budding initiated. All of the samples were processed in the the laboratory of plant molecular biology at the Facultad de Ciencias Agrícolas of the UAEM.

Electrophoretic procedure

Approximately 50 mg of fresh leaf tissue from each sample was homogenized using a plastic chopstick in 50 µL extraction buffer Tris-HCl (aminomethane hydroxymethyl) 0.1M, 2% EDTA-2Na (ethylene diamine tetracetic acid), 50.4% glycerol, 3.2% Tween-80, and 0.8% DTT (ditiotretol), pH 7.5 (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a). The samples were preserved at -20 °C until analysis. Two buffer systems of histidine-citric acid, pH 5.7 and pH 6.5 (H-AC) and Tris-citrate/Tris-histidine, pH 8.5 (T-C/T-H) were used following the procedures of Glaszmann *et al.* (1988) and Stuber *et al.* (1988). The 18 isozyme systems evaluated were aspartate amino transferase (AAT; EC 2.6.1.1), acid phosphatase (ACP; EC 13.1.3.2), dehydrogenase alcohol (ADH; EC 1.1.1.1), aminopeptidase (AMP; EC 3.4.11.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), endopeptidase (ENP; EC 3.4.23.6), esterase (EST; EC 3.1.1.1), formate dehydrogenase (FDH; EC 1.2.1.2), glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.2), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH; EC 1.1.1.49), malic enzyme (MAL; EC 1.1.1.40), malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37), phosphoglucose dehydrogenase (PGD; EC 1.1.1.44), phosphoglucose isomerase (PGI; EC 5.3.1.9), phosphoglucomutase (PGM; EC 2.7.5.1), phosphohexose isomerase (PHI; EC 5.3.1.8), peroxidase (POX; EC 1.11.1.7), and shikimate dehydrogenase (SKD; EC 1.1.1.25). The samples were loaded into a 12% hydrolyzed potato starch gel and electrophoresis was conducted at 4 °C for a mean duration of 3 h, 40-50 mA and 100-150 v. Each sample was

deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH; EC 1.1.1.49), enzima málica (MAL; EC 1.1.1.40), malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37), fosfogluconasa deshidrogenasa (PGD; EC 1.1.1.44), fosfogluconasa isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9), fosfoglucomutasa (PGM; EC 2.7.5.1), fosfohexosa isomerasa (PHI; EC 5.3.1.8), peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7) y shikimato deshidrogenasa (SKD; EC 1.1.1.25). Las muestras fueron cargadas en un gel de almidón hidrolizado de papa al 12 % y su electroforesis se hizo a 4 °C, con una duración media de 3 h, 40-50 mA y 100-150 v. Cada muestra se corrió un mínimo de tres veces para verificar su reproducibilidad. Los procedimientos de tinción enzimáticos se realizaron según las técnicas descritas por Torres *et al.* (1978), Vallejos (1983), Glaszmann *et al.* (1988), Stuber *et al.* (1988), Wendel y Weeden (1990) e Ishikawa (1994).

Análisis estadístico

Se elaboró un registro de los patrones de bandeo y a cada banda se asignó en una matriz binaria como ausente "0" o presente "1". Para conocer las relaciones genéticas y la agrupación de las variedades se hizo un dendrograma con los datos usando el programa POPGENE (ver. 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research, AB, Edmonton, Canadá) (Yeh and Boyle, 1999), usando el método UPGMA (modificado del procedimiento NEIGHBOR de la versión 3.5 de PHYLIP) (Felsenstein, 1990), basado en la matriz de distancias genéticas de Nei (Nei, 1972).

Para evaluar la posible relación entre la altitud geográfica de recolección de variedades y el valor de la diferenciación genética (D_G) de cada variedad, se hizo un análisis de correlación simple con el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 4.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de los patrones de bandeo

En el presente estudio, las nueve variedades de *T. pavonia* evaluadas fueron encontradas en estado silvestre y sometidas a un proceso de polinización libre; por tanto, fueron consideradas heterocigóticas, lo cual concuerda con los diversos PBI observados. De las 18 isoenzimas probadas se lograron teñir 12, pero sólo nueve mostraron suficiente resolución y nitidez para su registro y estudio. Algunas bandas fueron omitidas debido a su pobre resolución. Las isoenzimas ACP, MDH, PGI, PHI y PGM presentaron mejor resolución al ser analizadas con el sistema H-AC, pH 5.7; y las isoenzimas AAT y PGD en el mismo sistema, pero a un pH 6.5. En cambio, las isoenzimas CAT y POX lo hicieron en el sistema T-C/T-H. De las isoenzimas seleccionadas se obtuvieron nueve zimogramas donde se identificaron 32 bandas arregladas en 20 PBI: dos para AAT, dos para ACP, dos para CAT, cuatro para MDH, uno para PGD, uno para POX, tres para PGI, tres para

run at least three times to verify reproducibility. Enzyme staining was performed according to the procedures described by Torres *et al.* (1978), Vallejos (1983), Glaszmann *et al.* (1988), Stuber *et al.* (1988) Wendel and Weeden (1990) and Ishikawa (1994).

Statistical analysis

A record of banding patterns was constructed and each band was assigned to a binary matrix as absent, 0, or present, 1. To determine genetic relationships and variety grouping, a dendrogram was constructed with the data using POPGENE (ver. 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research, AB, Edmonton, Canada) (Yeh and Boyle, 1999) with the UPGMA method (modified from the NEIGHBOR procedure of PHYLIP, version 3.5) (Felsenstein, 1990), based on the Nei (1972) matrix of genetic distances.

To assess the possible relationship between geographic altitude of varieties collection and the value of genetic differentiation (D_G) of each variety, a simple correlation analysis was performed with the statistics software STATGRAPHICS Plus 4.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Description of banding patterns

In this study, the nine *T. pavonia* varieties evaluated were wild and free-pollinating. Therefore, they were considered to be heterozygotic; this agrees with the diverse IBPs observed. Of the 18 isozymes tested, 12 could be stained, but only nine had sufficient resolution and clarity to be recorded and studied. Some bands were omitted because of their poor resolution. The isozymes ACP, MDH, PGI, PHI and PGM had better resolution when examined with the H-AC system, pH 5.7, and the isozymes AAT and PGD in the same system, but at pH 6.5. In contrast, the isozymes CAT and POX were better in the T-C/T-H system. Of the selected isozymes, nine zimograms in which 32 bands arranged in 20 IBP were identified: two for AAT, two for ACP, two for CAT, four for MDH, one for PGD, one for POX, three for PGI, three for PHI, and two for PGM (Figure 1).

In this study most of the varieties could be identified by the IBP obtained in each isozyme, as we describe in the following sections.

Aspartate amino transferase

AAT showed five active bands (Figure 1A) and varieties with four bands arranged in two banding patterns were detected. Pattern 1 was observed in the ANG, CAR, DUL, MAR, PEN, and SAN varieties, while the GLO, SAM, and TRI varieties exhibited pattern 2 (Table 1).

PHI y dos para PGM (Figura 1). La mayoría de las variedades pudieron identificarse por su PBI obtenido con cada isoenzima, como se describe a continuación.

Aspartato amino transferasa

La AAT mostró cinco bandas activas (Figura 1A) y se detectaron variedades con cuatro bandas arregladas en dos patrones de bandeo. El patrón 1 se observó en las variedades ANG, CAR, DUL, MAR, PEN, SAN mientras que las variedades GLO, SAM y TRI mostraron el patrón 2 (Cuadro 1).

Fosfatasa ácida

La ACP mostró cuatro bandas activas (Figura 1B) y se detectaron variedades con una o con cuatro bandas, arregladas en dos patrones de bandeo. Las variedades ANG, CAR, DUL, GLO, MAR, PEN, SAN y TRI mostraron el patrón 1 compuesto por cuatro bandas. El patrón 2 tuvo una banda y se observó sólo en la variedad SAM (Cuadro 1).

Catalasa

La CAT produjo dos bandas activas (Figura 1C) y se detectaron variedades con una y con dos bandas, arregladas en dos patrones de bandeo. El patrón 1 con dos bandas se observó en las variedades CAR, DUL, MAR, PEN y SAM. El patrón 2 se observó en las variedades ANG, GLO, SAN y TRI (Cuadro 1).

Malato deshidrogenasa

La MDH mostró seis bandas activas (Figura 1D) y se detectaron variedades con tres y cuatro bandas en cuatro arreglos diferentes para producir cuatro patrones de bandeo. Los patrones 1, 2 y 3 estaban compuestos por cuatro bandas. El patrón 1 se observó en las variedades ANG, CAR, DUL, MAR, SAN y TRI, mientras que las variedades PEN y GLO mostraron los patrones 2 y 3. El patrón 4 tuvo tres bandas activas y se observó en la variedad SAM (Cuadro 1).

Fosfoglucona deshidrogenasa

La PGD produjo dos bandas activas (Figura 1E) arregladas en un sólo patrón, por lo cual no fue posible diferenciar ninguna de las variedades (Cuadro 1).

Peroxidasa

La POX produjo dos bandas activas (Figura 1F) arregladas en un sólo patrón, por lo cual no fue posible diferenciar ninguna de las variedades (Cuadro 1).

Acid phosphatase

ACP revealed four active bands (Figure 1B) and varieties with one or four bands arranged in two banding patterns were detected. The ANG, CAR, DUL, GLO, MAR, PEN, SAN, and TRI varieties exhibited pattern 1 with four bands. Pattern 2 had a single band and was seen only in the SAM variety (Table 1).

Catalase

CAT produced two active bands (Figure 1C), and varieties with one or two bands arranged in two banding patterns were detected. Pattern 1 with two bands was observed in CAR, DUL, MAR, PEN, and SAM. Pattern 2 was observed in ANG, GLO, SAN, and TRI (Table 1).

Malate dehydrogenase

MDH showed six active bands (Figure 1D) and varieties with three or four bands in four different arrangements were detected to produce four banding patterns. Patterns 1, 2, and 3 were composed of four bands. Pattern 1 was observed in ANG, CAR, DUL, MAR, SAN, and TRI, while PEN and GLO exhibited patterns 2 and 3. Pattern 4 had three active bands and was observed in SAM (Table 1).

Phosphoglucose dehydrogenase

PGD produced two active bands (Figure 1E) arranged in a single pattern, so that it was not possible to differentiate any of the varieties (Table 1).

Peroxidase

POX produced two active bands (Figure 1F) arranged in a single pattern, and thus it was not possible to differentiate varieties (Table 1).

Phosphoglucose isomerase

PGI produced four active bands (Figure 1G) and varieties with two, three or four bands arranged to produce three banding patterns were detected. Pattern 1 had four bands, and was observed in ANG, CAR, DUL, PEN, SAM, SAN, and TRI. Pattern 2 had three bands and was observed in MAR. Pattern 3 had two bands and was observed in GLO (Table 1).

Phosphohexose isomerase

PHI produced three active bands (Figure 1H) and varieties with two or three active bands in three

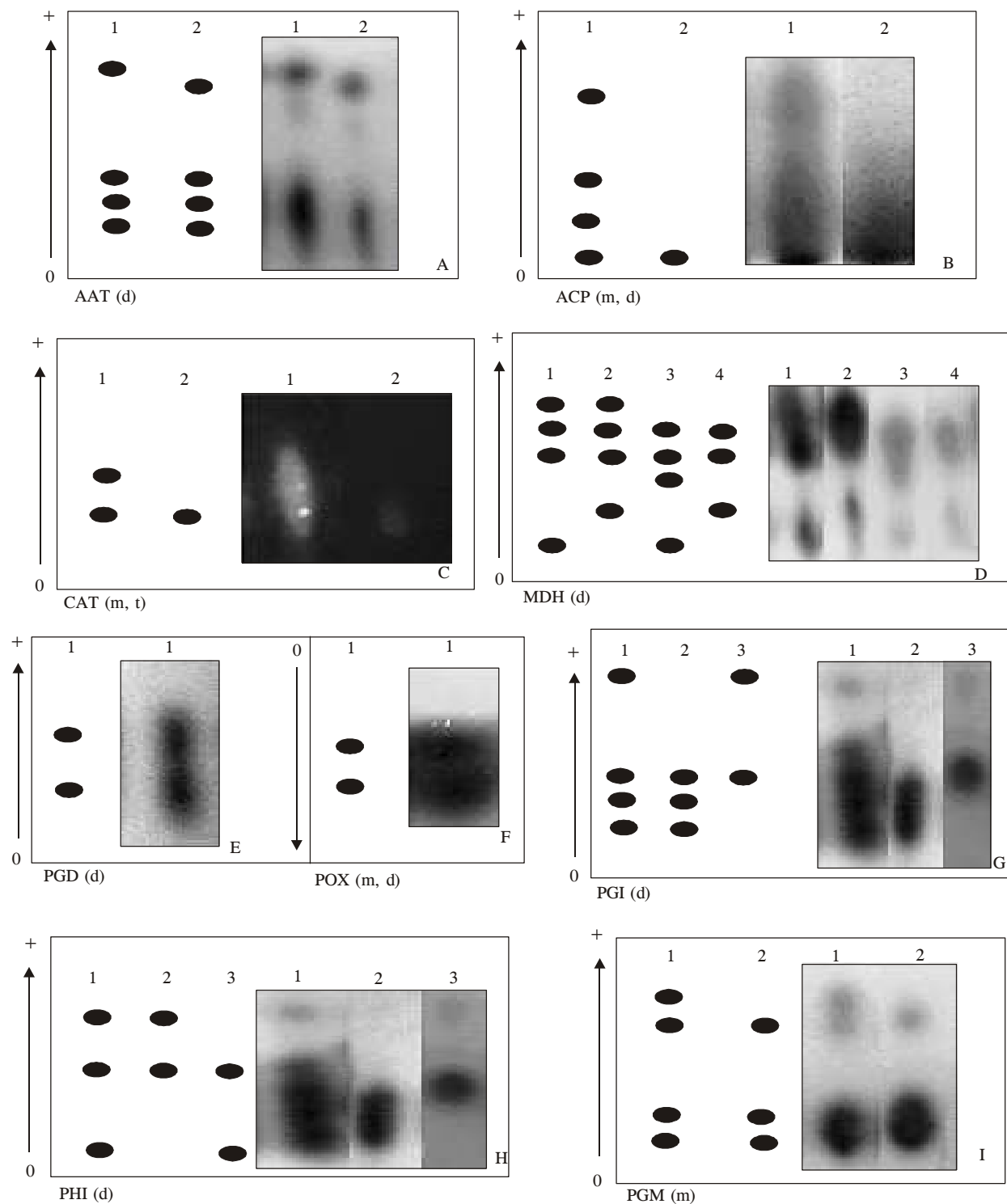


Figura 1. Representación esquemática de los patrones de bandeo isoenzimáticos (PBI) detectados en nueve variedades de *T. pavonia* (L. f.) DC., producidos por: A) AAT; B) ACP; C) CAT; D) MDH; E) PGD; F) POX; G) PGI; H) PHI; I) PGM. (m=monómero, d= dímero, t= trímero). “o” representa el origen de la electroforesis.

Figure 1. Schematic representation of isozyme banding patterns (IBP) detected in nine *T. pavonia* (L.f.) DC. varieties, produced by A) AAT; B) ACP; C) CAT; D) MDH; E) PGD; F) POX; G) PGI; H) PHI; I) PGM. (m=monomer, d=dimer, t=trimer. “o” represents origin of electrophoresis.

Cuadro 1. Caracterización isoenzimática de nueve variedades de *T. pavonia* (L. f.) DC., usando nueve sistemas isoenzimáticos. El número indica el patrón de bandeo isoenzimático (PBI) de cada variedad.**Table 1.** Isozyme characterization of nine *T. pavonia* (L.f.) DC. varieties using nine isozyme systems. The number indicates the isozyme banding pattern (IBP) of each variety.

Variedad	Isoenzima y patrón								
	AAT	ACP	CAT	MDH	PGD	POX	PGI	PHI	PGM
Ángeles ¹	1	1	2	1	1	1	1	1	2
Carolina ²	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Dulce ²	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Gloria	2	1	2	3	1	1	3	2	1
Mariana	1	1	1	1	1	1	2	3	2
Penélope	1	1	1	2	1	1	1	1	2
Samaria	2	2	1	4	1	§	1	2	2
Sandra ¹	1	1	2	1	1	1	1	1	2
Trinidad	2	1	2	1	1	1	1	1	2

AAT, aspartato amino transferasa; ACP, fosfatasa ácida; CAT, catalasa; MDH, malato deshidrogenasa; PGD, fosfoglucona deshidrogenasa; PGI, fosfoglucona isomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; PHI, fosfohexosa isomerasa; POX, peroxidasa.

^{1, 2} variedades con el mismo número no pudieron ser distinguidas con las isoenzimas evaluadas.

§ No fue posible determinar el PBI.

Fosfoglucona isomerasa

La PGI produjo cuatro bandas activas (Figura 1G) y se detectaron variedades con dos, tres y cuatro bandas arregladas para producir tres patrones de bandeo. El patrón 1 tuvo cuatro bandas y se observó en las variedades ANG, CAR, DUL, PEN, SAM, SAN y TRI. El patrón 2 tuvo tres bandas y se observó en la variedad MAR. El patrón 3 tuvo dos bandas y se observó en la variedad GLO (Cuadro 1).

Fosfohexosa isomerasa

La PHI produjo tres bandas activas (Figura 1H) y se detectaron variedades con dos y tres bandas activas, en tres arreglos, para producir tres patrones de bandeo. El patrón 1 tuvo tres bandas y se observó en las variedades ANG, CAR, DUL, PEN, SAN y TRI. Los patrones 2 y 3 tuvieron dos bandas cada uno. Las variedades GLO y SAM tuvieron el patrón 2 y la variedad MAR el patrón 3 (Cuadro 1).

Fosfoglucomutasa

La PGM produjo cuatro bandas activas (Figura 1I) y se detectaron variedades con tres y cuatro bandas, arregladas en dos patrones de bandeo. El patrón 1 tuvo cuatro bandas y sólo se observó en GLO. El patrón 2 tuvo tres bandas y se observó en ANG, CAR, DUL, MAR, PEN, SAM, SAN y TRI (Cuadro 1).

Como se aprecia en el Cuadro 1, las nueve isoenzimas produjeron bandas polimórficas suficientes para distinguir la mayoría de las variedades de *T. pavonia* evaluadas. De todas ellas, MDH produjo el

arrangement producing three banding patterns were detected. Pattern 1 had three bands and was observed in ANG, CAR, DUL, PEN, SAN, and TRI. Patterns 2 and 3 had two bands each. Varieties GLO and SAM exhibited pattern 2 and variety MAR pattern 3 (Table 1).

Phosphoglucomutase

PGM produced four active bands (Figure 1I) and varieties with three or four bands arranged in two banding patterns were observed. Pattern 1 had four bands and was observed only in GLO. Pattern 2 had three bands and was observed in ANG, CAR, DUL, MAR, PEN, SAM, SAN, and TRI (Table 1).

As can be seen in Table 1, the nine isozymes produced sufficient polymorphic bands to distinguish most of the *T. pavonia* varieties evaluated. Of all the isozymes, MDH produced the highest number (4) of IBP and, therefore, the highest percentage of polymorphism (18.75%). Based on the observed IBP, this isozyme allowed to differentiate a larger number of varieties. In contrast, the isozymes PGD and POX produced only one IBP, and therefore neither isozyme was useful for differentiating the varieties used.

Statistical analysis

Twenty-nine bands derived from seven isozymes were considered: five for AAT, four for ACP, two for CAT, six for MDH, four for PGI, three for PHI, and four for PGM (Figure 1). A dendrogram (Figure 2) was generated from the genetic relationship among these bands. Genetic analysis yielded an average genetic

mayor número (4) de PBI y por tanto el más alto porcentaje de polimorfismo (18.75%). Con base en los PBI observados la isoenzima permitió diferenciar un mayor número de variedades. Por el contrario, las isoenzimas PGD y POX produjeron sólo un PBI, por lo que no fueron útiles para diferenciar entre las variedades utilizadas.

Análisis estadístico

Se consideraron 29 bandas derivadas de siete isoenzimas: cinco para AAT, cuatro para ACP, dos para CAT, seis para MDH, cuatro para PGI, tres para PHI y cuatro para PGM (Figura 1). De la relación genética entre dichas bandas se generó un dendograma (Figura 2). Con el análisis genético se obtuvo un valor de distancia genética (D_G) promedio de 0.194 entre las nueve variedades de *T. pavonia* (Cuadro 2). Como se observa en el Cuadro 2, las variedades ANG y SAN y las variedades CAR y DUL mostraron un valor D_G de 0.0, apreciándose una similitud genética y a pesar del número de isoenzimas usadas, no fue posible distinguir tales variedades. En contraste, Vázquez-García *et al.* (2001a) caracterizaron morfológicamente estas cuatro variedades por la diferencia del color de sus flores en cada una de ellas: blanco-rojo y rojo-amarillo. Las variedades con el valor D_G más alto (0.421) fueron GLOR-MAR, GLO-PEN y MAR-SAM.

Un factor importante que probablemente influye en la diferenciación de variedades de la misma especie, es la altitud donde se localizan naturalmente. Al respecto y de acuerdo con los resultados del presente estudio, se observa en el dendograma dos grupos principales. En el grupo I se ubicaron siete variedades: ANG, SAN, CAR, DUL, MAR, PEN y TRI, que fueron recolectadas a una altitud de 2100 o 2250 m y un promedio de D_G de 0.074. En el grupo II sólo están las variedades GLO y SAM, recolectadas a 2600 m y un D_G de 0.374.

Según Wen y Hsiao (2001) y Arzate-Fernández *et al.* (2005b), las diferencias genéticas de poblaciones de *Lilium* podrían estar correlacionadas con la altitud, es decir, individuos recolectados a menores altitudes deberían tener una mayor similitud genética que aquellos de mayores altitudes. En el presente estudio fue posible establecer una estrecha relación entre la distancia genética de las nueve variedades de *T. pavonia* y las altitudes de recolección. Los resultados de la Figura 2 y del Cuadro 2, y los del análisis de correlación ($r=0.762$; $p\leq 0.01$), permiten inferir que la diferencia de altitudes entre los lugares de recolección, puede ser uno de los factores que determinan la agrupación de las variedades Gloria y Samaria, recolectadas a 2600 m y con una mayor variación genética que aquellas recolectadas entre 2100 y 2250 m.

distance (D_G) of 0.194 among the nine *T. pavonia* varieties (Table 2). As observed in Table 2, the D_G between ANG and SAN varieties and between CAR and DUL was 0.0, revealing genetic similarity and, in spite of the number of isozymes tested, it was not possible to distinguish one variety from the other. In contrast, Vázquez-García *et al.* (2001a) characterized these four varieties morphologically, differentiating them by flower color: white (ANG)-red (SAN) and red (CAR)-yellow (DUL). The varieties with the highest D_G value (0.421) were GLOR-MAR, GLO-PEN, and MAR-SAM.

An important factor that probably influences differentiation of varieties of the same species is the altitude of their natural habitat. In this respect and according to the results of this study, two main groups are observed in the dendogram. Group 1 comprises seven varieties: ANG, SAN, CAR, DUL, MAR, PEN, and TRI, which were collected at altitudes of 2100 or 2250 m, and average D_G was 0.074. Group II only includes the GLO and SAM varieties, collected at 2600 m and has a D_G of 0.374.

According to Wen and Hsiao (2001) and Arzate-Fernández *et al.* (2005b), the genetic differences in

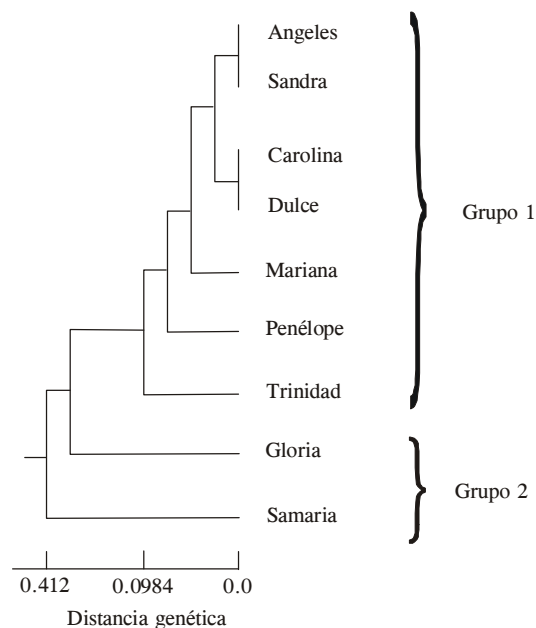


Figura 2. Dendograma de nueve variedades de *Tigridia pavonia*, obtenido con base en la distancia genética de Nei (1972), método UPGMA. Las cifras indican un cálculo de la distancia genética entre grupos y variedades, obtenido con marcadores isoenzimáticos.

Figure 2. Dendrogram of nine varieties of *Tigridia pavonia* based on Nei (1972) genetic distance, UPGMA method. Numbers indicate calculation of genetic distance between groups and varieties, obtained with isozyme markers.

CONCLUSIONES

Con la técnica de electroforesis de isoenzimas en gel de almidón fue posible caracterizar isoenzimáticamente nueve variedades botánicas de *T. pavonia*.

La distancia genética entre las variedades Ángeles-Sandra y Carolina-Dulce fue 0.0, y no fue posible distinguir una de otra con las nueve isoenzimas evaluadas.

Con las isoenzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa y peroxidasa no fue posible identificar las variedades estudiadas.

La isoenzima malato deshidrogenasa permitió diferenciar el mayor número de variedades de *T. pavonia*, generando cuatro patrones de bandeo.

De las nueve variedades botánicas de *T. pavonia*, Gloria presentó la mayor variabilidad isoenzimática.

El análisis de correlación mostró una relación estrecha entre la distancia genética de las nueve variedades de *T. pavonia* y la altitud del lugar donde fueron recolectadas. Las variedades Gloria y Samaria recolectadas a 2600 m tienen una mayor variación genética que aquellas recolectadas a 2100 o 2250 m.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos tanto a la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la U.A.E.M. como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento a la presente investigación, a través de los proyectos de investigación con clave UAEM No. 2106/2005 y CONACYT No. 52936.

LITERATURA CITADA

- Arzate-Fernández, A. M., C. O. Mejía G., T. Nakazaki, Y. Okumoto, and T. Tanisaka. 2005a. Isozyme electrophoretic characterization of 29 related cultivars of lily (*Lilium* spp.). *Plant Breeding* 124: 71-78.
- Arzate-Fernández, A. M., M. Miwa, T. Shimada, T. Tonekura, and K. Ogawa. 2005b. Genetic diversity of miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thumb. Var. Bukosanense), an endemic en-

populations of *Lilium* could correlate with altitude, that is, individuals collected at lower altitudes should have greater genetic similarity than those collected at higher altitudes. In this study it was possible to establish a close relationship between D_G of the nine *T. pavonia* varieties and the altitude at which they were collected. The results shown in Figure 2 and Table 2 as well as the correlation analysis ($r=0.762$; $p\leq 0.01$) suggest that the differences in altitudes among collection sites may be one of the factors that determine grouping of the Gloria and Samaria varieties, collected at 2600 m, which had greater genetic variation than those collected between 2100 and 2250 m.

CONCLUSIONS

With the starch gel isozyme electrophoresis technique, it was possible to characterize nine botanical varieties of *T. pavonia* isozymatically.

The genetic distance between the varieties Angeles and Sandra and between Carolina and Dulce was 0.0, and it was not possible to distinguish them with any of the nine isozymes evaluated.

With the isozymes 6-phosphogluconate dehydrogenase and peroxidase, it was not possible to identify any of the varieties studied.

The isozyme malate dehydrogenase was that which differentiated the largest number of *T. pavonia* varieties, generating four banding patterns.

Of the nine botanical varieties of *T. pavonia*, Gloria had the highest isozyme variability.

The correlation analysis revealed a close relationship between genetic distance of the nine *T. pavonia* varieties and collection altitude. The varieties Gloria and Samaria collected at 2600 m had greater genetic variation than those collected at 2100 or 2250 m.

End of the English version—



**Cuadro 2. Estimación de la distancia genética (D_G), según la fórmula de Nei (1972), para las nueve variedades de *T. pavonia*.
Table 2. Estimation of genetic distance (G_D), according to the formula of Nei (1972), for the nine varieties of *T. pavonia*.**

Variedad	ANG	CAR	DUL	GLO	MAR	PEN	SAM	SAN
ANG								
CAR	0.031							
DUL	0.031	0.000						
GLO	0.287	0.330	0.330					
MAR	0.098	0.064	0.064	0.421				
PEN	0.098	0.064	0.064	0.421	0.133			
SAM	0.374	0.330	0.330	0.374	0.421	0.246		
SAN	0.000	0.031	0.031	0.287	0.098	0.098	0.374	
TRI	0.064	0.098	0.098	0.207	0.169	0.169	0.287	0.064

- dangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biol.* 20:57-65.
- Bassiri, A., and M. W. Adams. 1977. Evaluation of common bean cultivar relationships by means of isozyme electrophoretic patterns. *Euphytica* 27:707-720.
- Booy, G., and L. W. D. Van Raamsdonk. 1998. Variation in the enzyme esterase within and between *Tulipa* species; usefulness for the analysis of genetic relationships at different taxonomical levels. *Biochemi Systematic Ecol.* 26: 199-224.
- Booy, G., C.A.E. Wouters, and Y. Kleyn-Noordijk. 1998: Identification of lily cultivars using isoelectric focusing of proteins from bulb scales and tissue culture bulblets. *Plant Breeding* 117: 57-62.
- Colunga-Garciamarin, P., J. Coello-Coello, L. E. Eguarte, and D. Piñero. 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. Angustifolia* (Agavaceae). *Am. J. Bot.* 86: 115-123.
- Felsenstein, J. 1990. *Phylyp Manual*, version 3.3. University Herbarium, University of California, Berkley, CA, USA.
- Gálvez, J., I. Clavero, R. López-Montero, J. F. Sánchez-Sevilla, and J. M. López-Aranda. 2001. Isozyme characterization of genetic resources in strawberry. *SHS Acta Horticulturae* 567: IV International Strawberry Symposium. pp: 69-72.
- Glaszmann, J. C., B. G. De los Reyes, and G. S. Khush. 1988. Electrophoretic variation or isozymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.) a key to the identification of 76 alleles at 24 loci. *IRRI Research Paper Series*. No. 134. 14 p.
- Ishikawa, R. 1994. Genetical studies on isozyme genes in rice (in japanese with english summary). *Bulletin Faculty of Agriculture Hirosaki Univerisity* 57: 105-180.
- Kephart, S.R., 1990: Starch gel electrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. *Am. J. Bot.* 77 (5): 693-712.
- Marquard, R.D., and Ch.R. Chan, 1995: Identifying Crabapple cultivars by isozymes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120 (5): 706-709.
- Molseed, E. 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mcorgadoexico and Central America. University of California Publications in Botany 54: 1-127.
- Nei M. 1972 Genetic distance between populations. *Am. Naturalist* 106: 282-283.
- Rodríguez, A. y J. Sytsma K. 2005. Phylogenetics of the "Tiger-flower" group (Tigridieae: Iridaceae): Molecular and morphological evidence. *Aliso* 22(1): 412-424.
- Stuber, C. W., J. Wendel, M. Goodman, and J. Smith. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.) *Tech. Bull.* 286. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina. 217 p.
- Torres, A. M., R. K. Soost, and U. Diedenhofen. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. *Am. J. Bot.* 65: 869-881.
- Tso, S. C., and R. Chen. 1997. Isolation and characterization of a group III isozyme of acid phosphatase from rice plants. *Botanical. Bull. Academia Sinica* 38: 245-250.
- Vallejos, E. 1983. Enzyme activity staining. *In: Tanksley, S. D., and T. J. Orton* (eds). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part A. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp: 459-416.
- Vázquez-García, L. M., y J. A. López-Sandoval. 2003. Plantas silvestres ornamentales del Estado de México. *In: Plantas Nativas de México con Potencial Ornamental*. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 146-158.
- Vázquez-García, L. M., A. A. Przybyla, E. De la Cruz T., H. Torres N., and G. Rodríguez. 2001a. Morphological description of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L. F.) Ker. Gawl. *J. Appl. Bot.* 75: 14-19.
- Vázquez-García, L. M., T. H. Norman M., y M. del C. Corona R. 2001b. *Oceloxochitl Tigridia pavonia* (L. f.) DC. Colección: Ciencias Naturales y Exactas, Serie: Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México. 69 p.
- Vicente, M. C., y T. Fulton. 2003. *Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje*. Illus. Nelly Giraldo. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia. 1: 1-52.
- Wen C. S., and J. Y. Hsiao. 2001. Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan Lily (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*; liliaceae) using RAPD markers and morphological characters. *Int. J. Plant Sci.* 162(2): 287-295.
- Wendel, J. F., and N. F. Weeden. 1990. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In: Soltis D. E., and P. S. Soltis.* (eds). *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Portland, Oregon. pp: 5-45.
- Yeh, F. C., and T. J. B. Boyle, 1999. Population genetics analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgium J. Bot.* 129:157.