

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DURANTE LAS FASES DE DESARROLLO VEGETATIVO Y REPRODUCTIVO EN LIRIO AZTECA (*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert)

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF BIOCHEMICAL MARKERS DURING VEGETATIVE DEVELOPMENT AND REPRODUCTIVE STAGES OF THE AZTEC LILY (*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert)

Rafael Mejía-Franco¹, Amaury M. Arzate-Fernández^{1*}, Alejandro Jaramillo-Frías¹, Luis M. Vázquez-García²

¹Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. 50200. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 11.5, entronque al Cerrillo, Campus Universitario "El Cerrillo", Toluca, Estado de México, México. (amaury1963@yahoo.com.mx). ²Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. 52400. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5, Ex Hacienda de Santa Ana, Tenancingo, Estado de México.

RESUMEN

Algunas isoenzimas intervienen en procesos de interés para los genetistas, tales como la floración, desarrollo de la planta, altura, resistencia a plagas y enfermedades, entre otras. Por lo tanto, es importante determinar si existe expresión diferencial en lirio azteca (*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert) durante las fases vegetativa y reproductiva utilizando marcadores bioquímicos. Por ello, durante estas fases se recolectó tejido de hojas, tépalos, gineceo y estambres. Estos tejidos se maceraron adicionando un amortiguador de extracción y los extractos líquidos totales se usaron para determinar patrones isoenzimáticos mediante electroforesis en geles de almidón. La actividad enzimática diferencial se evaluó utilizando once sistemas isoenzimáticos, de los cuales sólo se observaron nueve formas enzimáticas o patrones de bandeo isoenzimáticos (PBI): dos bandas con peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7), tres bandas con fosfatasa ácida (ACP; EC 13.1.3.2), una con fosfoglucomutasa (PGM; EC 2.7.5.1) y una para malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37), la cual mostró el mismo patrón de bandeo isoenzimático en todas las etapas de desarrollo de la planta. Para el propósito de esta investigación únicamente se consideraron los patrones de bandeo isoenzimáticos diferentes.

Palabras clave: *Sprekelia formosissima*, isoenzimas, expresión diferencial.

ABSTRACT

Some isozymes are involved in processes of interest to geneticists, such as flowering, plant development, height, pest and disease resistance, to name some. Therefore, it is important to determine, using biochemical markers, if there is differential expression during the vegetative and reproductive phases in the Aztec lily (*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert). To do so, during those stages we collected tissue from the leaves, tepals gynoecium and stamens. These were then macerated, an extraction buffer was added and the total liquid extracts were used to determine isozymatic patterns via electrophoresis in starch gels. The differential enzymatic activity was evaluated using eleven isozymatic systems, from which only nine enzyme forms or isozymatic band patterns (IBP) were observed: two bands with peroxidase (POX; EC 1.11.1.7), three bands with acid phosphatase (ACP; EC 13.1.3.2), one with phosphoglucose isomerase (PGI; EC 5.3.1.9), two for phosphoglucosyltransferase (PGM; EC 2.7.5.1) and one for malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), which showed the same pattern of isozymatic banding at all stages of the plant development. For the purpose of this research we only considered here the isoenzymatic banding patterns that were different.

Keywords: *Sprekelia formosissima*, isozymes, differential expression

INTRODUCTION

A primary goal of molecular biology is to understand how the genetic information is organized and how the genetic expression is

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2016. Aprobado: agosto, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 989-999. 2016.

INTRODUCCIÓN

Un objetivo principal de la biología molecular es saber cómo está organizada la información genética y cómo se regula su expresión. Así, al extraer el ADN de cualquiera de los órganos de un organismo y en cualquier etapa de su desarrollo no cambia en su secuenciación; es decir, permanece estable e intacto en su secuencia original. Las zonas activas de esta macromolécula con capacidad codificante, llamadas exones, estimulan la síntesis de enzimas específicas en las distintas etapas del desarrollo de un organismo. La propiedad catalítica de estas enzimas revela su presencia mediante métodos histoquímicos y desde 1957 los genetistas han usado la electroforesis para identificar miles de proteínas contenidas en un extracto crudo. Biomoléculas que tengan la misma propiedad catalítica se denominan isoenzimas.

Con isoenzimas o marcadores bioquímicos es posible realizar estudios de variabilidad genética, donde la variabilidad tisular (VT) se refiere a que varios tejidos u órganos de un mismo individuo muestran diferentes formas moleculares o distintas cantidades relativas de las mismas isoenzimas. Además, la variabilidad ontogénica (VO) se refiere a que en el mismo órgano en determinados momentos de su desarrollo (etapas fenológicas) se muestran diferentes formas moleculares o distintas cantidades relativas de la misma isoenzima. Así, se puede inferir que la VT y la VO son consecuencia de una regulación diferencial. De manera que cada tejido de un organismo tiene diferentes genes expresándose y en un mismo tejido en distintos momentos de su ciclo fenológico se expresan varios grupos de genes. En un corrimiento electroforético cada banda que aparece sobre el medio de soporte corresponde a una proteína diferente cuya síntesis puede estar controlada por uno o varios genes. Debido a que el orden y naturaleza de los aminoácidos determina la estructura primaria de una proteína, esta secuencia depende sólo de la información contenida en el ADN, la cual codifica para un polipéptido en particular. Así, los fenotipos observados sobre el medio de soporte pueden interpretarse en términos de genotipos, o sea en términos de genes y sus alelos.

Algunas características de las isoenzimas importantes para los genetistas son: 1) Una proporción de estos genes son polimórficos, o sea existen en la

regulada. Thus, extracting DNA from any tissue of an organism at any stage of development does not change their DNA sequence; meaning it is stable and identical to the original sequence. Active zones of this macromolecule with coding capacity, are called exons, and they stimulate the synthesis of specific enzymes in the different stages of development of an organism. The catalytic property of these enzymes reveal its presence by histochemical methods. Since 1957 geneticists have used electrophoresis to identify thousands of proteins contained in a raw cellular extract. Biomolecules that have the same catalytic property are called isozymes.

With isozymes or biochemical markers it is possible to perform genetic variability studies, where tissue variability (TV) means that various tissues or organs from the same individual show different molecular forms or different relative amounts of the same isozyme. In addition, the ontogenetic variability (OV) refers that in the same organ at certain stages of development (phenological stages) different molecular forms or different relative amounts of the same isozyme are shown. Thus, we can infer that both the TV and the OV are the result of differential regulation. So, every tissue of an organism has different genes expressions and in the same tissue at different points of the phenological cycle diverse groups of genes are expressed. In an electrophoresis gel each band that appears on the support matrix corresponds to a different protein whose synthesis may be controlled by one or more genes. Due to the fact that the order and nature of the amino acids determine the primary structure of the protein, this sequence depends only on the information contained in the DNA, which encodes a particular polypeptide. Thus, the phenotypes observed on the support matrix can be interpreted in terms of genotypes, in other words, in terms of genes and their alleles.

For geneticists, some of the most important isozyme's characteristics are: 1) A proportion of these genes are polymorphic, this means that they are in the form of one or more alleles; and 2) these alleles are co-dominant, in other words, both alleles are expressed in heterozygous organisms; this phenomenon allows to relate the observed phenotypes with a given genotype. When interpreting isozymatic phenotypes in a support matrix, it should be considered its quaternary structure, depending on the number of polypeptide subunits (one, two, three or four). This

forma de uno o más alelos; y 2) estos alelos son co-dominantes, es decir ambos alelos se expresan en los organismos heterocigóticos; este fenómeno permite relacionar los fenotipos observados con un genotipo dado. Al interpretar de los fenotipos isoenzimáticos en un medio de soporte debe considerarse su estructura cuaternaria, en función de si tiene una, dos, tres o cuatro subunidades polipeptídicas que permiten clasificarlos como monómeros, dímeros, trímeros o tetrameros, respectivamente, cuyo patrón de bandeo para el homocigótico queda representado, en todos los casos, por un solo alelo.

Sin embargo, para los heterocigóticos los transcritos codifican para proteínas asociadas con dos alelos (monómero), tres alelos (dímero), cuatro alelos (trímero) y cinco alelos (tetramero). Entonces, un estudio a través de isoenzimas puede detectar la presencia de diferentes formas moleculares de estas proteínas, en etapas específicas del desarrollo de un organismo, de lo cual se infiere que la presencia de una nueva o diferente isoenzima en un estado o etapa específica del desarrollo podría estar controlando un proceso por aquella(s) isoenzima(s). Por ello, para aumentar la eficiencia de la técnica, podrían identificarse las etapas de desarrollo de la planta durante las cuales la proteína se manifiesta (Kephart, 1990).

Para calcular y detectar productos génicos se usa electroforesis en geles de poliacrilamida o de almidón. El análisis isoenzimático por electroforesis es una técnica sólida, reproducible y poderosa con numerosas aplicaciones debido a que las isoenzimas presentan expresión codominante (Kephart, 1990), y porque no exhiben efectos ambientales (Marquard y Chan, 1995). Además de confiables, son relativamente más económicos que aquellos de tipo de ADN y permiten obtener información enzimática de diferentes tejidos (Vicente y Fulton, 2003). El análisis de las isoenzimas se ha realizado con éxito en varias especies vegetales: *Nicotiana tabacum* L. (Stafford y Galston, 1970), *Zea mays* L. (Scandalios, 1964; Efron, 1970; Rao *et al.*, 1997), *Hordeum vulgare* L. (Pedersen y Simonsen, 1987), *Cereus peruvianus* (Machado *et al.*, 1993), *Cucurbita pepo* L. (Carpin *et al.*, 1999), *Brassica oleraceae* (Bellani *et al.*, 2002), plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae* (Ros-Barceló y Aznar-Asensio, 2002), *Mammillaria gracillis* Pfeiff. (Balén *et al.*, 2003), *Tigridia pavonia* (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a) y *Lilium* spp. (Arzate-Fernández *et al.*, 2005b).

allows us to classify them as monomers, dimers, trimers or tetramers, respectively, and the banding pattern for homozygous is represented, in all cases, by a single allele.

Nevertheless, in heterozygotes the transcripts encode for proteins associated with two alleles (monomers), three alleles (dimers), four alleles (trimers) and five alleles (tetramers). Hence, a study using isozymes can detect the presence of different molecular forms of these proteins at specific stages of development of an organism, from which it is inferred that the presence of a new or different isozyme in a specific state or stage of development might be controlling a process by the isozymes themselves. Therefore, to increase the efficiency of the technique, the developmental stages of the plant could be identified when the protein is expressed (Kephart, 1990).

Electrophoresis in polyacrylamide or starch gels is used to calculate and detect gene products. The isozyme analysis by electrophoresis is a strong, reproducible and powerful technique with numerous applications because isozymes present co-dominant expression (Kephart, 1990) and because they do not exhibit ambient effects (Marquard and Chan, 1995). Besides the method's reliability, they are relatively cheaper than those of DNA analysis and allows us to obtain enzymatic information from different tissues (Vicente and Fulton, 2003). The isozyme's analysis have been performed successfully in several plant species: *Nicotiana tabacum* L. (Stafford and Galston, 1970), *Zea mays* L. (Scandalios, 1964, Efron, 1970; Rao *et al.*, 1997), *Hordeum vulgare* L. (Simonsen and Pedersen, 1987), *Cereus peruvianus* (Machado *et al.*, 1993), *Cucurbita pepo* L. (Carpin *et al.*, 1999), *Brassica oleraceae* (Bellani *et al.*, 2002), plants belonging to the family *Asteraceae* (Ros-Barceló and Aznar-Asensio, 2002) *Mammillaria gracillis* Pfeiff. (Balén *et al.*, 2003), *Tigridia pavonia* (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a) and *Lilium* spp. (Arzate-Fernández *et al.*, 2005b).

Sprekelia formosissima (L.) Herbert, also known as Aztec lily, is a species native to Mexico that is still considered wild, it belongs to the *Amaryllidaceae* family and is characterized by being bulbous, annual and of short of cycle. It grows in grasslands and stony fields in the states of Durango, Jalisco, Guanajuato, Hidalgo, Estado de Mexico, Mexico City, Puebla, Veracruz, Guerrero and Oaxaca (Lopez-Ferrari and

Sprekelia formosissima (L.) Herbert, también conocida como lirio azteca, es una especie originaria de México que aún se considera silvestre, pertenece a la familia Amaryllidaceae y se caracteriza por ser bulbosa, anual y de ciclo corto. Crece en pastizales y pedregales de los estados de Durango, Jalisco, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Distrito Federal, Puebla, Veracruz, Guerrero y Oaxaca (López-Ferrari y Espejo-Serna, 2002). El valor ornamental de esta especie se debe al color rojo escarlata de sus flores, por lo que en México es común cultivarla en jardines y como planta medicinal (Vázquez-García *et al.*, 1998). Pese al potencial ornamental de esta especie, no se han realizado estudios empleando isoenzimas para *S. formosissima*. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión diferencial (la variación tisular y ontogénica) en esta planta silvestre mediante marcadores bioquímicos para determinar las diferentes formas enzimáticas que se expresan en la etapa vegetativa y reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se usaron plantas de lirio azteca (*S. formosissima* (L.) Herbert cv. Terciopelo, obtenidas de clones de bulbos, cultivadas 78 d en un sustrato compuesto por hojarasca, arena y estiércol de bovino en proporción 1:1:1, en un invernadero rústico en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

El ciclo de cultivo de *S. formosissima* se dividió en dos etapas fenológicas para evaluar su expresión diferencial: etapa vegetativa y etapa reproductiva (floración). Durante la etapa vegetativa sólo se obtuvieron muestras de tejido de hoja (H). En la etapa reproductiva, que se presentó después de la brotación de las primeras hojas, con una duración de unos 40 d, se recolectaron muestras de tejido proveniente de tépalos (T), estigma-estilo (G), estambre (E) y hoja (H).

Una vez que emergieron las plántulas, todos los muestreos se realizaron cada 8 d y en cada uno de ellos se tomaron muestras de los tejidos disponibles. En la etapa reproductiva se realizaron tres muestreos: el primero sólo fue de H, el segundo de T, G y E, y el tercero de H, T, G y E. En la etapa vegetativa se realizaron siete muestreos, todos ellos de H (Cuadro 1). En cada muestreo se recolectó muestra de tejido, de al menos tres plantas, colocarlo dentro de una bolsa Ziploc, y depositarlo en una hielera para conservarlo a -20°C en un congelador doméstico. Todas las muestras se procesaron en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMex.

Espejo-Serna, 2002). The ornamental value of this species is given by its scarlet flowers; therefore, in Mexico it is frequently seen in gardens and used as a medicinal plant (Vázquez-García *et al.*, 1998). Despite the ornamental potential of the species, no studies have been carried out using isozymes for *S. formosissima*. Therefore, the objective of this study was to evaluate the differential expression (tissue variation and ontogenetic variation) in this wild plant with biochemical markers, to determine the different enzyme forms expressed in the vegetative and reproductive stages.

MATERIALS AND METHODS

In this study we used Aztec lily plants (*S. formosissima* (L.) Herbert cv. Terciopelo, obtained from cloned bulbs and grown in a substrate composed of: leaf litter, sand and bovine manure in a 1:1:1 ratio for 78 days, in a rustic greenhouse at the Faculty of Agricultural Sciences at the Universidad Autónoma del Estado de Mexico (UAEMex).

The *S. formosissima* cultivation cycle was divided into two phenological stages to evaluate their differential expression: vegetative stage and reproductive stage (flowering). During the vegetative stage only tissue samples from the leaves (H) were collected. In the reproductive stage, which initiated after the first sprouting of leaves, and continued for approximately 40 d, the tissue samples were obtained from tepals (T), stigma-style (G), stamens (E) and leaves (H).

Once the seedlings emerged, the tissue sampling took place every 8 days, in each sampling all available tissues were collected. During the reproductive stage three samplings were carried out: the first was only H, the second of T, G and E, and the third H, T, G and E. In the vegetative stage seven samples were taken, all of H. Each sample consisted in collecting tissue samples of at least three plants, the samples were placed into Ziploc bags, and placed in a cooler and then kept at -20°C in a domestic freezer. All samples were processed at the Laboratory of Plant Molecular Biology, in the Faculty of Agricultural Sciences of the UAEMex.

Electrophoretic procedure

The extraction of total proteins was performed using approximately 50 mg of fresh tissue, each sample was homogenized with a plastic crowbar in 2 ml Eppendorf tubes with 50 L extraction buffer Tris-HCl (hydroxymethyl aminomethane) 0.1M, EDTA 2Na-(ethylene diamino tetraacetic) 2 %, glycerol 50.4 %, tween-80 3.2 % and DTT (dithiothreitol) 0.8 %, pH 7.5 (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a). Once the proteins were

Procedimiento electroforético

La extracción de proteínas totales se realizó usando aproximadamente 50 mg de tejido fresco, cada muestra se homogeneizó con una barreta de plástico en tubos Eppendorf de 2 mL, con 50 μ L 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 (ditiotreitól) 0.8 %, pH 7.5 (Arzate-Fernández *et al.*, 2005a). Una vez extraídas las proteínas, cada muestra se conservó a -20°C hasta su análisis. Dos sistemas amortiguadores se usaron: histidina-ácido cítrico, pH 5.7 y pH 6.5 (H-AC) y Tris-citrato/Tris-histidina, pH 7.8 (T-C/T-H), según los procedimientos de Glaszmann *et al.* (1988) y Stuber *et al.* (1988). Los cinco sistemas isoenzimáticos evaluados fueron: peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7), fosfatasa ácida (ACP; EC 13.1.3.2), fosfogluco isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9), fosfoglucomutasa (PGM; EC 2.7.5.1) y malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37). Las muestras se cargaron usando el sobrenadante en un gel hidrolizado de almidón de papa al 12 %, realizando el corrimiento electroforético a 4°C , y 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 histoquímicos se realizaron según las técnicas descritas por Torres *et al.* (1978) en *citrus*, Vallejos (1983), Stuber *et al.* (1988) usaron extractos de *Zea mays* L., Wendel y Weeden (1990), Glaszmann *et al.* (1988) e Ishikawa (1994) en arroz (*Oryza sativa* L.).

Para la expresión diferencial se consideró la presencia o ausencia de bandas en cada etapa fenológica (vegetativa y reproductiva) de las plantas muestreadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cinco sistemas electroforéticos se observaron bandas con suficiente resolución y nitidez para su registro y análisis (Cuadro 1). Las isoenzimas PGI, PGM y MDH mostraron mejor resolución con el sistema histidina-ácido cítrico a pH 5.7; mientras que la isoenzima ACP mostró una mejor resolución en el mismo amortiguador, pero a un pH de 6.5. En el caso de POX, hubo mejor resolución en el sistema tris-citrato/tris-histidina a un pH de 7.8.

Las cinco isoenzimas produjeron 15 bandas y nueve patrones de bandeo isoenzimáticos (PBI) (Figura 1): dos para POX, tres para ACP, uno para PGI, dos para PGM y uno para MDH. El PBI obtenido con cada isoenzima en ambas etapas fenológicas se describe a continuación.

extracted, all the samples were stored at -20°C until they were analyzed. Two buffer systems were used: histidine-citric acid, pH 5.7 and pH 6.5 (H-AC) and Tris-citrate/Tris-histidine, pH 7.8 (T-C/T-H) were used according to the procedures of Glaszmann *et al.* (1988) and Stuber *et al.* (1988). The five isozyme systems evaluated were: peroxidase (POX; EC 1.11.1.7), acid phosphatase (ACP; EC 13.1.3.2), phosphoglucose isomerase (PGI; EC 5.3.1.9), phosphoglucomutase (PGM; EC 2.7.5.1) and malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37). The supernatant of the samples was loaded into a hydrolyzed potato starch gel 12 %, the electrophoretic shift was made at a temperature of 4°C , with a mean duration of 3 h, 40-50 mA and 100-150 v. Each sample was tested at least three times to check reproducibility. Histochemical staining procedures were performed according to the techniques described by Torres *et al.* (1978) in citrus, Vallejos (1983), Stuber *et al.* (1988) used extracts of *Zea mays* L., and Wendel and Weeden (1990), Glaszmann *et al.* (1988) and Ishikawa (1994) in rice (*Oryza sativa* L.).

For differential expression it was considered the presence or absence of each band in every phenological stage (vegetative and reproductive) of the sampled plants.

RESULTS AND DISCUSSION

Bands with enough sharpness and resolution for registration and further analysis were observed in five electrophoretic systems (Table 1). The PGI, PGM and MDH isozymes showed better resolution in the citric acid-histidine system at pH 5.7; whereas the ACP isozyme showed improved resolution in the same buffer, but at pH 6.5. In the POX case, better resolution was provided by the Tris citrate/Tris-histidine system at pH 7.8.

The five isozymes produced 15 bands and nine isozyme banding patterns (IBP) (Figure 1): two for POX, three for ACP, one for PGI, two for PGM and one for MDH. The IBP obtained with each isozyme in both phenological stages is described below.

Peroxidase (POX)

Plants have numerous POX enzymes that differ in location within the plant and between species. POX enzymes have an important function in lignin biosynthesis (Conroy *et al.*, 1982), hormone generation and detoxification of hydrogen peroxide. They are also associated with physical and biochemical processes such as growth, cell formation, development of fruits, ethylene synthesis

Cuadro 1. Patrones de bandedo isoenzimáticos (PBI) observados en las etapas de desarrollo fenológico (reproductiva y vegetativa) en *Sprekelia fromosissima* (L) Herbert.
Table 1. Isozyme banding patterns (IBP) observed in the different phenological development stages (reproductive and vegetative) in *Sprekelia fromosissima* (L) Herbert.

Isoenzima	Tipo de tejido colectado en la etapa fenológica (Número de muestreo)															
	Reproductiva								Vegetativa							
	H (1)	T (2)	G (2)	E (2)	H (3)	T (3)	G (3)	E (3)	H (4)	H (5)	H (6)	H (7)	H (8)	H (9)	H (10)	
POX (m, d) (+)	— —	— — —	— —	— — —	— — —	— — —	— —	— — —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
ACP (m, d)	— — —	— —	—			—	—	—	— —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	
PGI (d)					— —	— —	— —	— —	— —							
PGM (m)	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —		— — —	— —		— —	— —	— —	— —	— —	
MDH (d)	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	

Del (1) al (10) representa el número de muestreo; "o": Origen de la electroforesis; H: Hoja; T: Tépal; G: Estigma-Estilo; E: Estambre; m: monómero; d: dímero ❖ Numbers (1) to (10) means the number of sampling; "o": Origin of electrophoresis; H: Leaf; T: Tepal; G: Stigma-Style; E: Stamen; m: monomer; d: dimer.

Peroxidasa (POX)

Las plantas tienen numerosas enzimas POX las cuales difieren en su localización dentro de la planta y entre especies. Las POX tienen una función importante en la biosíntesis de lignina (Conroy *et al.*, 1982), generación de hormonas y desintoxicación por peróxido de hidrógeno. Además, se encuentran asociadas con procesos físicos y bioquímicos como crecimiento, formación celular, desarrollo de frutos, síntesis de etileno y también en mecanismos de respuesta a diferentes formas de estrés (Matamoros *et al.*, 2003). La expresión de esta enzima está en un amplio intervalo de tipos tisulares vegetales durante la etapa reproductiva (Passardi *et al.*, 2004). En nuestro estudio, en el sistema POX se observaron cuatro bandas activas con diferentes tasas de migración; las cuales fueron agrupadas en dos PBI, uno con dos bandas (1) y otro con tres bandas (2)

and response mechanisms to different forms of stress (Matamoros *et al.*, 2003). The expression of this enzyme is in a wide range of plant tissue types during the reproductive stage (Passardi *et al.*, 2004). In our study, the POX system showed four active bands with different migration rates; the bands were grouped into two IBP, one with two bands (1) and one with three bands (2) (Figure 1A). In pattern 1, the side closer to the origin was stronger compared to the second one. Both IBP were observed in the reproductive stage while in the vegetative stage only pattern 1 was observed. During the reproductive stage only two samples were collected from H; in the first sample, pattern 1 was observed and in the third sample extract pattern 2 was observed, which is also expressed in tissues T and E in the same stage, whereas in the two extracts of G, pattern 1 was observed, as shown in Table 1. These results are consistent with those reported by McInnis *et al.* (2006) who pointed

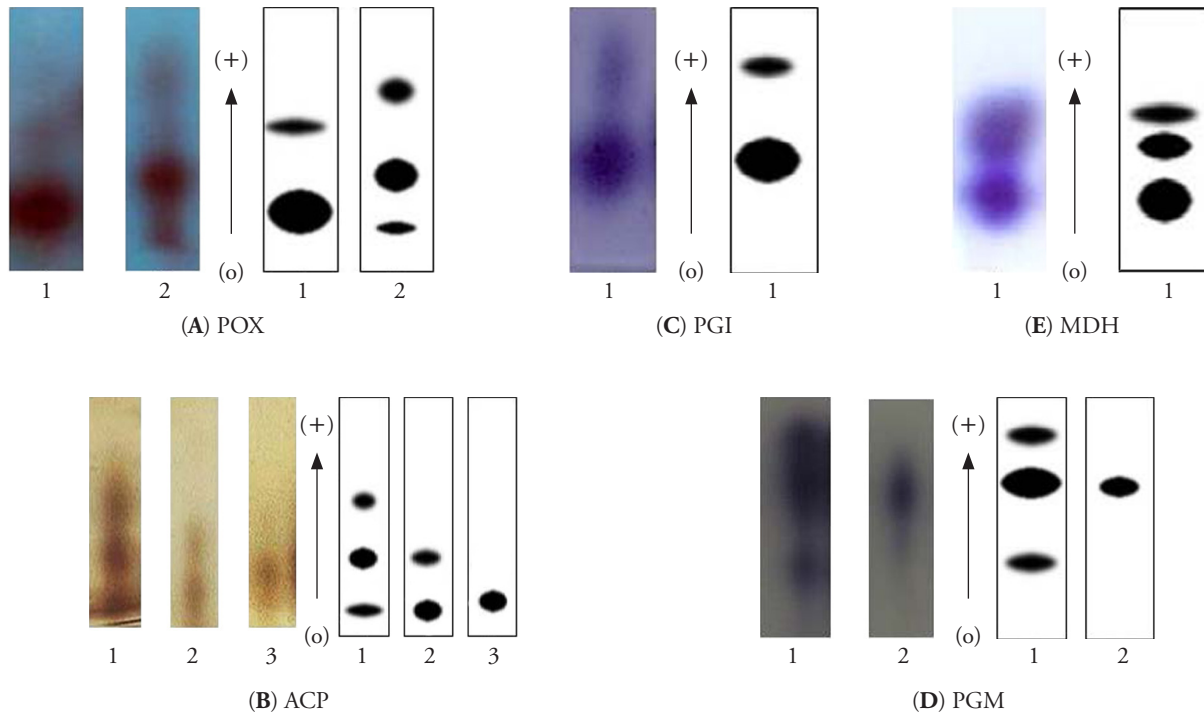


Figura 1. Representación esquemática de los patrones de bandeo isoenzimáticos (PBI) en *Sprekelia formosissima* utilizando marcadores bioquímicos: (A) POX en sistema Tris-citrato, pH 7.8; (B) ACP en sistema Histidina-Ácido-cítrico, pH 6.5; (C) PGI en sistema Histidina-Ácido-cítrico, pH 5.7; (D) PGM en sistema Histidina-Ácido-cítrico, pH 5.7; (E) MDH en sistema Histidina-Ácido-cítrico, pH 5.7. Números en pie de figura representan el número de patrón de bandeo isoenzimático (PBI), mientras “o” representa el origen de la electroforesis.

Figure 1. Schematic representation of isozyme banding patterns (IBP) in *Sprekelia formosissima* using biochemical markers: (A) POX in Tris-citrate system, pH 7.8; (B) ACP in Histidine-citric acid system, pH 6.5; (C) PGI in Histidine-citric acid system, pH 5.7; (D) PGM in Histidine-citric acid system, pH 5.7; (E) MDH in Histidine-citric acid system, pH 5.7. Numbers figure footer represent the number of isozyme banding pattern (IBP), while “o” represents the origin of the electrophoresis.

(Figura 1A). En el patrón 1, la banda cercana al origen fue más intensa en comparación con la segunda. Ambos PBI se observaron en la etapa reproductiva mientras que en la etapa vegetativa sólo se observó el patrón 1. Durante la etapa reproductiva se recolectaron únicamente dos muestras de H; en la primera se observó el patrón 1 y en el extracto del tercer muestreo de H se observó el patrón 2, el cual también se expresa en tejidos de T y E de la misma etapa, mientras que en los dos extractos de G se observó el patrón 1, como se muestra en el Cuadro 1. Estos resultados coinciden con los reportados por McInnis *et al.* (2006) en *Senecio squalidus*, durante la etapa reproductiva de esta especie identificaron la presencia de isoformas específicas de peroxidasa las cuales probablemente participan en el complejo proceso de reconocimiento celular de la etapa de polinización.

out that in *Senecio squalidus* during the reproductive stage of this species specific isoforms of peroxidases were identified, which are probably involved in complex process of cellular recognition during the pollination period.

Acid phosphatase (ACP)

In plants, the ACPs are described in several species, tissues and cell compartments, and its main function is the collection and recycling of phosphate (Li *et al.*, 2002; Bozzo *et al.*, 2006). Furthermore, the ACPs exhibit activity during different stages of development such as flowering and germination (Duff *et al.*, 1994; Bozzo *et al.*, 2002). In our study, when using ACP three active bands were detected and three IBPs, the first with three bands, the second with two and the third with a single band (Figure

Fosfatasa ácida (ACP)

En las plantas, las ACP están descritas en varias especies, tejidos y compartimentos celulares, y su función principal es la obtención y reciclaje de fosfato (Li *et al.*, 2002; Bozzo *et al.*, 2006). Además, las ACP exhiben actividad durante diferentes etapas de desarrollo como floración y germinación (Duff *et al.*, 1994; Bozzo *et al.*, 2002). En nuestro estudio, usando ACP se observaron tres bandas activas y tres PBI, el primero con tres bandas, el segundo con dos y el tercero con una sola banda (Figura 1B). La existencia de expresión diferencial se constató a través del sistema ACP, pues durante la etapa reproductiva se observaron los tres PBI. En esta etapa, el primer muestreo de tejido de H exhibió primer patrón y en el tercer muestreo no se observó ninguna banda (Cuadro 1). En la muestra de T se observó el patrón 2 y 3 (Cuadro 1), mientras que el patrón 3 se expresó en tejido de las muestras de G y en la tercera muestra de E. En el segundo muestreo de E no se observó ninguna banda.

Durante la etapa vegetativa, el sistema ACP generó los PBI 1 y 2. El tejido de H de la cuarta muestra exhibió el patrón 2 y todas las muestras restantes de H mostraron el patrón 1. Estos resultados son similares a los reportados en una monocotiledónea por Pedersen y Simonsen (1987), quienes evaluaron tejidos de hojas de diferentes posiciones en la planta.

Fosfoglucoasa isomerasa (PGI)

La PGI es una enzima que participa activamente en el metabolismo de azúcares en la mayoría de los organismos eucariotas; además, se localiza en plastidios y citosol de angiospermas. En nuestro estudio la PGI mostró dos bandas activas y un solo PBI (Figura 1C). Esto indica la existencia de expresión diferencial a través del sistema PGI, es decir, esta isoenzima no mostró especificidad tisular pero sí especificidad ontogénica en su expresión, pues en la etapa reproductiva se observó sólo en el tercer muestreo en tejidos de H, T, G y E, y sólo en tejido de H al inicio de la etapa vegetativa (cuarto muestreo) (Cuadro 1). Por lo tanto, es posible que esta isoenzima tenga una función preponderante durante el proceso de floración de *S. formosissima*.

1B). The existence of differential expression was found through the ACP system, because during the reproductive stage all three IBPs were observed. At this stage, the first sampling of H tissue exhibited the first pattern and in the third sampling we could not detect any band (Table 1). In the tissue sample of T, patterns 2 and 3 were observed (Table 1), while pattern 3 was expressed in tissue samples from G and in the third sample of E. In the second sampling of E we did not observe any band.

During the vegetative stage, the ACP system generated the IBP 1 and 2. The H tissue of the fourth sample exhibited pattern 2 and all remaining tissue samples of H showed pattern 1. These results are similar to those reported in a monocot by Pedersen and Simonsen (1987), who evaluated leaf tissues in different positions of the plant.

Phosphoglucose isomerase (PGI)

The PGI is an enzyme that is actively involved in the metabolism of sugars in most eukaryotic organisms; also it is located in plastids and in the cytosol of angiosperms. In our study the PGI showed two active bands and a single IBP (Figure 1C). This indicates the existence of differential expression throughout the PGI system, in other words, this isozyme showed no tissue specificity but it showed ontogenetic specificity in its expression, hence in the reproductive stage it was observed only in the third sampling of tissues of H, T, G and E and in H tissue only at the beginning of the vegetative stage (fourth sampling) (Table 1). Therefore, this isozyme may have a major role during the flowering process of *S. formosissima*.

Phosphoglucomutase (PGM)

PGM is actively involved in the metabolism of sugars, it catalyzes the conversion of glucose-1 and glucose-6 phosphate in the synthesis and consumption of sucrose. Mühlbach and Schnarrenberger (1978) indicate that PGM is present in plants and that it is possible to obtain a pattern with two active bands often located in the cytosol and chloroplasts. In our study, in the PGM system we detected differential expression due to the observation of three active bands and two IBP; the first with three bands and the second with one band (Figure 1D). PGM showed

Fosfoglucomutasa (PGM)

La PGM participa activamente en el metabolismo de azúcares, es decir cataliza la conversión de glucosa-1 y glucosa-6 fosfato en la síntesis y el consumo de sacarosa. Mühlbach y Schnarrenberger (1978) indican que PGM está presente en plantas y es posible obtener un patrón con dos bandas activas que con frecuencia se localizan en el citosol y cloroplastos. En nuestro estudio, con el sistema PGM se observó expresión diferencial porque se encontraron tres bandas activas y dos PBI, el primero con tres bandas y el segundo con una banda (Figura 1D). PGM mostró actividad enzimática con poca variabilidad en ambas etapas fenológicas de desarrollo. Durante la etapa reproductiva sólo se observó el patrón 1 en los tejidos muestreados, pero en los tejidos G, del tercer muestreo no se observaron bandas que evidenciaran actividad enzimática. En la etapa vegetativa el patrón 1 sólo se observó en tejidos del cuarto muestreo, mientras que en los tejidos de H se observó el patrón 2 del sexto al décimo muestreo, posiblemente por la mayor presencia de cloroplastos en tejido de H (Cuadro 1).

Malato deshidrogenasa (MDH)

La MDH es una enzima que, según su localización subcelular, participa activamente en el ciclo de Krebs, la fotorrespiración, y otras rutas catabólicas y anabólicas (Machado *et al.*, 1993). En nuestro estudio, MDH presentó tres bandas activas con un solo PBI (Figura 1E), todas ellas presentes en ambas etapas fenológicas del desarrollo y en todos los tejidos muestreados (Cuadro 1). MDH fue el único sistema isoenzimático con el cual no se observó expresión diferencial en ambas etapas fenológicas.

En los organismos vivos el ADN es el compuesto más importante porque contiene la información hereditaria que determina la estructura de las proteínas, las cuales, para su expresión durante el proceso de desarrollo y diferenciación celular, involucran factores como hormonas, tipo de luz, longitud del día, temperatura, etc., que son determinantes en la regulación de la expresión génica o en su expresión diferencial (Grierson y Covey, 1991). Las isoenzimas pueden usarse como herramientas en el mejoramiento genético (Arzate-Fernández *et al.*, 2005b) y el proceso de expresión diferencial se ha estudiado en maíz (Scandalios, 1964; Efron, 1970; Rao *et al.*, 1997),

very little variability in the enzymatic activity during both phenological stages of development. During the reproductive stage only pattern 1 was obtained in the sampled tissues, but in the third sampling of G tissues, no bands that prove enzymatic activity were observed. In the vegetative stage, pattern 1 was only observed in tissues of the fourth sampling, whereas in H tissues, pattern 2 was observed from the sixth up to the tenth sampling, probably this is due to the increased number of chloroplasts in tissue H (Table 1).

Malate dehydrogenase (MDH)

MDH is an enzyme that, according its subcellular localization, actively participates in the Krebs cycle, photorespiration, and other catabolic and anabolic pathways (Machado *et al.*, 1993). In our study, MDH presented three active bands with a single IBP (Figure 1E), all present in both development stages and all sampled tissues (Table 1). MDH was the only isozyme system in which no differential expression was observed in both phenological stages.

In living organisms DNA is the most important molecule, because it encodes the hereditary information that determines the proteins structure, which, for its expression during development and cell differentiation, they involve factors such as hormones, light type, day length, temperature, etc., This factors are crucial in the regulation of gene expression or in their differential expression (Grierson and Covey, 1991). Isozymes can be used as genetic improvement tools (Arzate-Fernández *et al.*, 2005b) and the process of differential expression has been studied in maize (Scandalios, 1964, Efron, 1970. Rao *et al.*, 1997), tobacco (Stanford and Galston, 1970), barley (Pedersen and Simonsen, 1987) and *Brassica oleraceae* (Bellani *et al.*, 2002), using electrophoresis in starch gels with samples of different parts of the plant such as leaves, stems, roots, young and mature ears, sheath, pollen grains, tissue scutellum, and *in vitro* plant lets.

CONCLUSIONS

With the horizontal electrophoresis technique on starch gels, differential isozyme banding patterns were identified throughout two phenological stages of *Sprekelia formosissima*. This technique has advantages

tabaco (Stanford y Galston, 1970), cebada (Pedersen y Simonsen, 1987) y *Brassica oleraceae* (Bellani *et al.*, 2002), utilizando electroforesis en geles de almidón con muestras de diferentes partes de la planta como la hoja, el tallo, la raíz, las espigas jóvenes y maduras, la vaina, los granos de polen, los tejidos de escutelo, y los brotes obtenidos *in vitro*.

CONCLUSIONES

Con la técnica de electroforesis horizontal sobre geles de almidón, se identificaron los patrones de bandeo isoenzimáticos diferenciales durante dos etapas fenológicas de *Sprekelia formosissima*. Esta técnica presenta ventajas respecto a los marcadores moleculares de ADN porque pueden obtenerse varios geles al mismo tiempo y éstos teñirse hasta con siete enzimas, reduciendo tiempos y costos.

Los PBI obtenidos en nuestro estudio con los marcadores bioquímicos peroxidasa, fosfatasa ácida, fosfoglucoisomerasa y fosfoglucomutasa, indican que esta técnica es útil en investigaciones de expresión diferencial en la etapa vegetativa y reproductiva para *S. formosissima*, así como una herramienta de diagnóstico en un programa de mejoramiento genético o en un estudio de variabilidad o diversidad genética.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento a la presente investigación, a través del proyecto con clave UAEM 2211/2006; y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a Rafael Mejía Franco para realizar estudios de Maestría en el Programa de Posgrado de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la UAEMex.

LITERATURA CITADA

- Arzate-Fernández, A. M., A. Hoyos-Basurto, L. M. Vázquez-García, and M. G. Gutiérrez-Martínez. 2005a. Isozyme characterization of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia* 42: 519-528.
- Arzate-Fernández, A. M., O. Mejía-González, T. Nakazaki, Y. Okumoto, and T. Tanisaka. 2005b. Isozyme electrophoretic characterization of 29 related cultivars of lily (*Lilium* spp.). *Plant Breeding* 124: 71-78.
- Balen B., M. Krsnik-Rasol, and V. Simeon-Rudolf. 2003. Isoenzymes of peroxidase and esterase related to

over molecular DNA markers, given that several gels can be obtained at the same time and the gels can be dyed with up to seven enzymes, reducing times and costs.

The IBP obtained in our study with the following biochemical markers: peroxidase, acid phosphatase, glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase indicate that this technique is useful in investigations of differential expression in vegetative and reproductive stages of *S. formosissima* as well as a diagnosis tool in breeding programs or in a genetic variability or diversity studies.

—End of the English version—



- morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *J. Plant Physiol.* 160: 1401-1406.
- Bellani, L. M., M. Guarnieri, and A. Scialabba. 2002. Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleraceae* seeds. *Physiol. Plantarum.* 114: 102-108.
- Bozzo, G. G., K. G. Raghothama, and W. C. Plaxton. 2002. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Eur. J. Biochem.* 269: 6278-86.
- Bozzo, G. G., E. L. Dunn, and W. C. Plaxton. 2006. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell Environ.* 29: 303-13.
- Carpin, S., M. Crevecoeur, H. Greppin, and C. Penel, C. 1999. Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol.* 120: 799-810.
- Conroy, J. M., D. C. Borzelleca, and L. A. McDonnell. 1982. Homology of plant peroxidases on immunochemical approach. *Plant Physiol.* 69: 28-31.
- Duff, S. M. G., G. Sarath, and W. C. Plaxton. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.* 90: 791-800.
- Efron, Y. 1970. Tissue specific variation in the isozymes pattern of the AP1 acid phosphatase in maize. *Genetics* 65: 575-583.
- Glaszmann, J. C., B. G. De los Reyes, and G. S. Khush. 1988. Electrophoretic variation or isoenzymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.) a key to the identification of 76 alleles at 24 loci. IRR Research Paper Series. No. 134. 14 p.
- Grierson, D., y S. N. Covey. 1991. *Biología Molecular de las Plantas*. Ed. Acirbia. S.A. Zaragoza, España. pp: 103-127.
- Ishikawa, R. 1994. Genetical studies on isozyme genes in rice (In Japanese with English summary). *Bulletin Faculty of Agriculture Hirosaki University.* 57: 105-180.
- Kephart, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Am. J. Bot.* 77: 693-712.

- Li, D. P., H. F. Zhu, K. F. Liu, X. Liu, G. Leggewie, M. Udvardi, and D. W. Wang. 2002. Purple acid Phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *J. Biol. Chem.* 27: 277-281.
- López-Ferrari A. R, y A. Espejo-Serna. 2002. Amaryllidaceae. *In: Sosa, V., L. C. Rodríguez, T. Duncan, M. T. Mejía-Saulés, N. P. Moreno, M. Nee, L. I. Nevling, J. Rzedowski J., y B. G. Schubert (eds). Flora de Veracruz. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México. 32 p.*
- Machado, M. F., A. J. Prioli, and C. A. Mangolin. 1993. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.* 31: 167-172.
- Marquard, R. D., and Ch. R. Chan. 1995. Identifying Crabapple cultivars by isozymes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 706-709.
- Matamoros, M. A., D. A Dalton, J. Ramos, M. R. Clemente, M. C. Rubio, and M. Becana. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 133: 499-509.
- McInnis, S. M., D. C. Emery, R. Porter, R. Desikan, J. T. Hancock, and S. J. Hiscock. 2006. The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *J. Exp. Bot.* 57: 1835-1846.
- Mühlbach, H., and C. Schnarrenberger. 1978. Properties and intracellular- distribution of 2 phosphoglucomutases from spinach leaves. *Planta* 141: 65-70.
- Passardi, F., C. Penel, and C. Dunand. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9: 534-540.
- Pedersen, S., and V. Simonsen. 1987. Tissue specific and developmental expression of isozymes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* 106: 59-66.
- Rao, K.V., P. Suprasanna, and G. M. Reddy. 1997. Differential expression of esterase and MDH isozymes during *in vitro* culture in maize (*Zea mays* L.). *Act. Physiol. Plantarum* 19: 29-32.
- Ros-Barceló, A., and G. J. Aznar-Asensio. 2002. Basic peroxidases in cell walls of plants belonging to the Asteraceae family. *J. Plant Physiol.* 159: 339-345.
- Scandalios, J. G. 1964. Tissue- specific isozymes variation in maize. *The J. Heredity:* 281-285.
- Stafford, H. A., and A. W. Galston. 1970. Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isozymes in tobacco pith. *Plant Physiol.* 46: 763-767.
- 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.
- 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: 416-459.*
- Vázquez-García, L. M., T. H. Norman-Mondragón, y M. del C. Corona-Rodríguez. 1998. El Lirio Azteca. Colección: Ciencias Naturales y Exactas, Serie: Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México. 29 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.*
- 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.*