



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LIRIO AZTECA (*Sprekelia formosissima* (L)
HERBERT, MEDIANTE MARCADORES BIOQUÍMICOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

RAFAEL MEJÍA FRANCO

COMITÉ DE TUTORES:

**DR. AMAURY-MARTÍN ARZATE-FERNÁNDEZ
DR. LUIS-MIGUEL VÁZQUEZ-GARCÍA**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Febrero 2016.

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO		PÁGINA
1	Patrones de bandeo isoenzimáticos (PBI) observados en las etapas de desarrollo fenológico (reproductiva y vegetativa) en <i>Sprekelia fromosissima</i> (L) Herbert.	15
FIGURA		
1	Representación esquemática de los patrones de bandeo isoenzimáticos (PBI) en <i>Sprekelia fromosissima</i> (L) Herbert 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 el Eje “Y” representan el número de patrón de bandeo isoenzimático (PBI); mientras “o” representa el origen de la electroforesis.	17

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura, es una de las actividades económicas más añejas de la historia, le ha permitido al hombre satisfacer sus necesidades alimenticias mediante el cultivo de cereales, granos, legumbres, frutos, forrajes para la alimentación de ganado y la producción de especies ornamentales de corte y macetearía.

La rama florícola es de gran importancia económica en México y diferentes partes del mundo debido a la generación de empleos e ingresos generados por la venta de flores en maceta y corte en las diferentes épocas pico del año; las más importantes en México son: día de San Valentín, día de la madre, del padre, muertos y celebración del día de la virgen de Guadalupe. Para satisfacer la demanda en estas fechas, se cultivan diferentes especies florícolas entre las que destacan rosa, lílis, áster, solidago, girasol, crisantemos, entre otras.

Por otra parte, en México existen especies silvestres que tienen enorme potencial ornamental y amplia diversidad genética como el lirio azteca (*Sprekelia formosissima* (L) Herbert) que se ha utilizado desde tiempos prehispánicos por sus propiedades medicinales, alimenticias y por la belleza de sus flores rojas escarlata. En algunos países europeos como España e Inglaterra, existen empresas que comercializan durante todo el año material vegetativo de la especie (Vázquez-García *et al.*, 1998).

Hasta la fecha, en México existen pocos trabajos de investigación en lirio azteca que citen avances en algún campo del conocimiento, principalmente en el mejoramiento genético y la biología molecular.

Uno de los objetivos que tiene esta última, es saber cómo está organizada la información genética a través del estudio del ADN y los mecanismos que regulan la expresión de genes. Una de las herramientas empleadas es la electroforesis horizontal sobre geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas,

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. Estos productos

génicos provienen de diferencias determinadas genéticamente en la secuencia de aminoácidos y no incluye modificaciones postraduccionales de la secuencia o estructura. (Scragg, 2000).

En el presente trabajo, empleando la técnica de electroforesis sobre geles se logró identificar los diferentes patrones de bandeo en tejidos de *S. formosissima* colectados durante la fase vegetativa y reproductiva

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El Lirio azteca es una especie herbácea que pertenece a la familia *Amaryllidaceae*, se caracteriza por ser una planta con bulbos escamosos alargados de color oscuro, de tallo corto o rizomas. Tienen hojas gruesas, de borde liso, carnosas-fibrosas de una longitud de 30 a 40 cm de altura que aparecen después de la floración. Presenta flores solitarias sobre un escapo fistuloso y hueco de superficie lisa, de color verde claro y cilíndrico que mide de 30 a 50 cm de largo., el perigonio es grande, simétrico, cabizbajo de color escarlata y con la base amarillenta., con seis tépalos poco desiguales, el posterior ascendente y el inferior ahuecado. Es una familia heterogénea que comprende entre 70 y 85 géneros. (Martínez, 1957 y Sánchez, 1976 citados por Vázquez-García *et al.*, 1998, Lozano, 1992).

Con los avance tecnológico de las últimas décadas, el uso de los geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas se demostró que dentro de un organismo la existencia de las isoenzimas, formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. Aunque la vasta mayoría de proteínas son enzimas, muchas proteínas tienen roles estructurales en la biosíntesis de lignina, desintoxicación de peróxido, reciclaje de fosfatos entre otras. Para estos estudios se han utilizado varias estructuras de la planta, tales como hojas, raíces o botones florales, de las cuales se obtiene un extracto crudo proteico. La técnica consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de un teñido histoquímico. De este modo se separan enzimas codificadas por genes diferentes o producto de diferentes alelos de un mismo gen.

Los genetistas usan electroforesis desde 1957, para aprovechar la propiedad catalítica de las enzimas que permiten revelar su presencia mediante métodos histoquímicos. Desde entonces se identificaron miles de diferentes proteínas contenidas en un extracto crudo, a pocas biomoléculas que tengan la misma propiedad catalítica y se les denomina isoenzimas. A través de 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 pero en determinados momentos de su desarrollo (etapas fenológicas) muestran diferentes formas moleculares o distintas cantidades relativas de la misma isoenzima. De esta manera, se puede inferir que tanto la VT como 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 amino ácidos determina la estructura primaria de una proteína, esta secuencia depende únicamente de la información contenida en el ADN, la cual codifica para un polipéptido en particular. De esta manera, 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 que las hacen importantes para los genetistas son: 1) Una proporción de estos genes son polimórficos, o sea existen en la forma de uno o más alelos, y 2) estos alelos son codominantes, es decir ambos alelos se expresan en los organismos heterocigóticos; este fenómeno permite relacionar los fenotipos observados con un genotipo dado. En la interpretación 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 lo que permite a la vez clasificarlos como monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros, 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 a dos alelos (monómero), a tres alelos (dímero), a cuatro alelos (trímero) y a cinco alelos para el tetrámero. Entonces, un estudio a través de isoenzimas puede detectar la presencia de nuevas 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 tanto, para aumentar la eficiencia de la técnica, podrían identificarse las etapas de desarrollo de la planta durante los cuales la proteína se manifiesta.

El cálculo y la detección de productos génicos fueron posibles utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida o de almidón. El análisis isoenzimático, a través de 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 molecular y permiten obtener información enzimática de diferentes tejidos (Vicente y Fulton, 2003). El análisis de las isoenzimas se realiza 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), *Lilium* spp. (Arzate-Fernández *et al.*, 2005b), entre otros.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, *Sprekelia formosissima* (L) Herbert es considerada una especie silvestre en México y prácticamente se desconocen trabajos que permitan conocer los productos enzimáticos que participan o controlan importantes procesos como el crecimiento vegetativo, floración o inducción de la senescencia., por lo que la identificación de estos, servirá de precedente de futuras investigaciones que contribuyan al mejoramiento genético para la obtención nuevas variedades o productos de uso farmacéutico.

IV. HIPOTESIS

Es posible que en los diferentes tejidos de la etapa vegetativa y reproductiva de *Sprekelia formosissima* (L) Herbert, se expresen diferentes formas moleculares y se pueden detectar utilizando la técnica de Electroforesis horizontal sobre geles de Almidón.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar si existe expresión diferencial enzimática en plantas de *Sprekelia formosissima* (L) Herbert cultivadas bajo invernadero rústico de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), utilizando la técnica de electroforesis horizontal sobre geles de Almidón.

5.2. Objetivos específicos.

- Obtener los patrones de bandeo isoenzimático de tejidos de hoja, tépalo, gineceo y estambre empleando los sistemas enzimáticos: 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).
- Identificar los patrones de bandeo diferentes en cada etapa del desarrollo de *S. formosissima* (L) Herbert.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material y equipo

Para realizar el trabajo de investigación se requirió de los siguientes materiales y equipos:

- Invernadero rústico
- Laboratorio (gas, agua y luz)
- Desionizador de agua
- Destilador de agua
- Horno de microondas
- Baño María
- Mesa de trabajo
- Sillas de plástico
- Triturador de hielo
- Congelador – 20 °C
- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Carro metálico
- Agitadores magnéticos
- Placa de agitación y calentamiento
- Cámaras de electroforesis para isoenzimas
- Fuente de poder con control digital de amperage, voltaje y Watage
- Equipo de computo
- Scanner
- Fotocopiadora
- Impresora láser

6.2. Material vegetativo

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

6.3. Colecta y almacenamiento de muestras

El ciclo de cultivo de las plantas de *S. formosissima* (L) Herbert se dividió en dos etapas fenológicas para evaluar su expresión diferencial: etapa vegetativa y etapa reproductiva (floración).

En la etapa reproductiva se colectaron muestras de tejido proveniente de tépalos (T), gineceo (G), estambre (E) y hoja (H); y durante la etapa vegetativa únicamente se obtuvieron muestras de tejido de H. En el presente trabajo de investigación, la etapa reproductiva se presentó después de la brotación de las primeras hojas; con una duración de aproximadamente 40 días.

Una vez que emergieron las plántulas, todos los muestreos se realizaron cada 8 días, y en cada uno de ellos se tomaron muestras de los tejidos disponibles en ese momento. En la etapa reproductiva se realizaron tres muestreos: el primero solo 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. Cada muestreo consistió en colectar la muestra de tejido, en al menos tres plantas, colocarlo dentro de una bolsa Ziploc, e inmediatamente depositarlo en una hielera para posteriormente conservarlo a -20° C en un congelador doméstico. Todas las muestras se procesaron en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMex.

6.4. Procedimiento electroforético

Se realizó la extracción de proteínas totales utilizando aproximadamente 50 mg de tejido fresco, homogeneizando cada muestra con una barreta de plástico en tubos Eppendorf de 2 mL, con 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 (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. Se usaron dos sistemas amortiguadores de 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 utilizando el sobrenadante en un gel hidrolizado de almidón de papa al 12 % y el corrimiento electroforético fue llevado a cabo 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 histoquímicos 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).

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

VII. RESULTADO Y DISCUSIÓN



Editorial del Colegio de Postgraduados

10 de noviembre de 2015

Dr. Amaury-Martín Arzate-Fernández
amaury1963@yahoo.com.mx

Le comunico que su manuscrito fue recibido en Agrociencia para la revisión inicial previa al proceso de arbitraje y se le asignó la clave: 15-314

TÍTULO: EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LIRIO AZTECA (*Sprekelia formosissima*), MEDIANTE
MARCADORES BIOQUÍMICOS

AUTORES: Rafael Mejía-Franco, Amaury-Martín Arzate-Fernández, Alejandro Jaramillo-Frías y Luis-Miguel
Vázquez-García

Agradezco su interés por publicar en Agrociencia y le saludo atentamente.

SERGIO S. GÓNZALEZ MUÑOZ
DIRECTOR DE AGROCIENCIA

❖ SSGM/yfm

• Oficina Central • Guerrero #9 Esquina Avenida Hidalgo •
• 56251, San Luis Huastilla, Texcoco, Estado de México •
• (01(595) 928.4427 • 01(595) 928.4013 •

• Colegio de Postgraduados • Campus Montecillo • Estadística •
• Carretera México-Texcoco, Km. 36.5, 56230, Montecillo •
• Texcoco, Estado de México •

• Apartado Postal 199, 56100, Texcoco •
• Apartado Postal 56, 56230, Chapingo •
• editoriakp@colpos.mx •

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LIRIO AZTECA (*Sprekelia formosissima* (L) Herbert),
MEDIANTE MARCADORES BIOQUÍMICOS**

**DIFFERENTIAL EXPRESSION IN LIRIO AZTECA (*Sprekelia formosissima* (L) Herbert),
USING BIOCHEMICAL MARKERS**

Rafael Mejía-Franco¹, Amaury-Martín Arzate-Fernández^{1*}, Alejandro Jaramillo-Frías¹ y Luis-Miguel Vázquez-García²

RESUMEN

Algunas isoenzimas intervienen en procesos específicos de interés para los genetistas, tal como la floración, desarrollo de las plantas, altura, resistencia a plagas y enfermedades entre otras. Por lo que es importante determinar si existe expresión diferencial en lirio azteca (*Sprekelia formosissima* (L) Herbert) durante las fases vegetativa y reproductiva por medio de marcadores bioquímicos. Durante estas fases, se recolectó tejido procedente de las hojas, los tépalos, el gineceo, y los estambres, y se maceraron adicionando un amortiguador de extracción, y cuyos extractos líquidos totales se usaron para determinar patrones isoenzimáticos mediante electroforesis en geles de almidón (SGE). 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), a saber: dos bandas con peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7), tres bandas mediante fosfatasa acida (ACP; EC 13.1.3.2), una con fosfoglucosa isomerasa (PGI; EC 5.3.1.9), dos para fosfoglucomutasa (PGM; EC 2.7.5.1) y una para malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37), la cual mostró el mismo PBI 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.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos de la biología molecular es saber cómo está organizada la información genética y cómo se regula su expresión. Así, al extraer el ADN de un organismo, de cualquiera de sus órganos y en cualquier etapa de su desarrollo, este 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.

Los genetistas usan electroforesis desde 1957, para aprovechar la propiedad catalítica de las enzimas que permiten revelar su presencia mediante métodos histoquímicos. Desde entonces se identificaron miles de diferentes proteínas contenidas en un extracto crudo, a pocas biomoléculas que tengan la misma propiedad catalítica y se les denomina isoenzimas. A través de 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 pero en determinados momentos de su desarrollo (etapas fenológicas) muestran diferentes formas moleculares o distintas cantidades relativas de la misma isoenzima. De esta manera, se puede inferir que tanto la VT como 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 amino ácidos determina la estructura primaria de una proteína, esta secuencia depende únicamente de la información contenida en el ADN, la cual codifica para un polipéptido en particular. De esta manera, 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 que las hacen importantes para los genetistas son: 1) Una proporción de estos genes son polimórficos, o sea existen en la forma de uno o más alelos, y 2) estos alelos son codominantes, es decir ambos alelos se expresan en los organismos heterocigóticos; este fenómeno permite relacionar los fenotipos observados con un genotipo dado. En la interpretación 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 lo que permite a la vez clasificarlos como monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros, 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 a dos alelos (monómero), a tres alelos (dímero), a cuatro alelos (trímero) y a cinco alelos para el tetrámero. Entonces, un estudio a través de isoenzimas puede detectar la presencia de nuevas 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 tanto, para aumentar la eficiencia de la técnica, podrían identificarse las etapas de desarrollo de la planta durante los cuales la proteína se manifiesta.

El cálculo y la detección de productos génicos fueron posibles utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida o de almidón. El análisis isoenzimático, a través de 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 molecular y permiten obtener información enzimática de diferentes tejidos (Vicente y Fulton, 2003). El análisis de las isoenzimas se realiza 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), *Lilium* spp. (Arzate-Fernández *et al.*, 2005b), entre otros.

En el presente estudio se usaron plantas de *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.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

El ciclo de cultivo de las plantas de *S. formosissima* (L) Herbert) se dividió en dos etapas fenológicas para evaluar su expresión diferencial: etapa vegetativa y etapa reproductiva (floración). En la etapa reproductiva se recolectaron muestras de tejido proveniente de tépalos (T), estigma-estilo (G), estambre (E) y hoja (H); y durante la etapa vegetativa únicamente se obtuvieron muestras de tejido de

H. En la investigación, la etapa reproductiva se presentó después de la brotación de las primeras hojas; con una duración aproximada de 40 d.

Una vez que emergieron las plántulas, todos los muestreos se realizaron cada 8 días, y en cada uno de ellos se tomaron muestras de los tejidos disponibles en ese momento. En la etapa reproductiva se realizaron tres muestreos: el primero solo 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. Cada muestreo consistió en colectar la muestra de tejido, en al menos tres plantas, colocarlo dentro de una bolsa Ziploc, e inmediatamente depositarlo en una hielera para posteriormente conservarlo a -20° C en un congelador doméstico. Todas las muestras se procesaron en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMex.

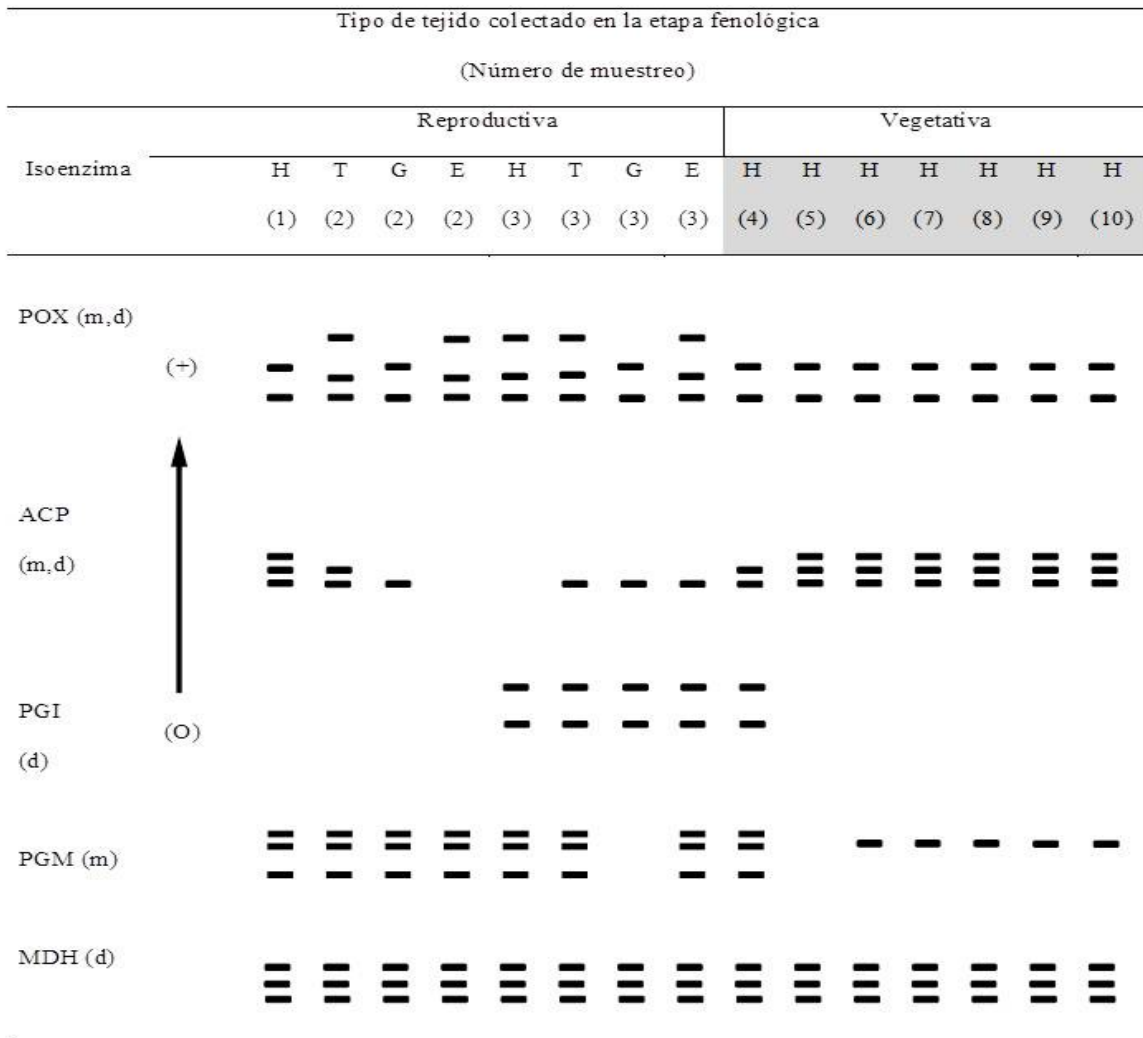
Procedimiento electroforético

Se realizó la extracción de proteínas totales utilizando aproximadamente 50 mg de tejido fresco, homogeneizando cada muestra con una barreta de plástico en tubos Eppendorf de 2 mL, con 50 µl del 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. Se usaron dos sistemas amortiguadores de 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), fosfoglucoasa 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 utilizando el sobrenadante en un gel hidrolizado de almidón de papa al 12%, realizando el corrimiento electroforético a una temperatura de 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 histoquímicos 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).

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 logró observar bandas con suficiente resolución y nitidez para su posterior 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 buffer pero a un pH de 6.5, sin embargo, en el caso de POX esta presentó mejor resolución en el sistema tris-citrato/tris-histidina a un pH de 7.8.



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

En el presente trabajo, cinco isoenzimas produjeron un total de 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 etapa fenológicas, se describe a continuación:

Peroxidasa

Las plantas tienen numerosas enzimas POX las cuales difieren en su localización dentro de la planta y entre especies. Las POX juegan un papel importante en la biosíntesis de lignina (Conroy *et al.*, 1982), generación de hormonas, 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 se reporta en un amplio rango de tipos tisulares vegetales durante la etapa reproductiva (Passardi *et al.*, 2004). En el presente estudio, en este sistema se observaron cuatro bandas activas (Figura 1a) con diferentes tasas de migración; las cuales fueron organizadas en dos PBI, en el primero con dos bandas y el segundo con tres bandas (Figura 1a). En el patrón 1 la banda cercana al origen fue más intensa en comparación que la segunda. Ambos PBI (1 y 2) se observaron en la etapa reproductiva mientras que en la etapa vegetativa sólo se observó el patrón 1. Durante la etapa reproductiva se colectaron únicamente dos muestras de H; en el primero se observó el patrón 1 mientras en el extracto del segundo muestreo de H se logró observar el patrón 2, el cual también se expresa en tejidos de T y E en la misma etapa, mientras que en los dos extractos de G se observó el patrón 1.

Fosfatasa ácida (ACP)

En las plantas, las ACP están descritas en varias especies, tejidos y compartimentos celulares, cuya principal función es la obtención y reciclaje de fosfato (Li *et al.*, 2002; Bozzo *et al.*, 2006) así mismo, las ACP exhiben actividad durante diferentes etapas de desarrollo como floración y germinación (Duff *et al.*, 1994; Bozzo *et al.*, 2002). En el presente 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). Se pudo constatar la existencia de expresión diferencial 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 el patrón 1, pero en el mismo tejido de H, en el tercer muestreo, no se logró observar ninguna banda (Cuadro 1). En la muestra de T se observó el patrón 2 y 3 (Cuadro 1), mientras que el patrón 3 fue expresado 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 la visualización de 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. Resultados similares fueron reportados en una monocotiledónea por Pedersen y Simonsen (1987) quienes evaluaron tejidos de hojas de diferentes posiciones en la planta.

Fosfoglucosa isomerasa (PGI)

La PGI es una enzima que participa activamente en el metabolismo de azúcares en la mayoría de los organismos eucariotas (Nelson y Cox, 2008), además se sabe que se localiza en plastidios y citosol de angiospermas. En el presente estudio la PGI mostró dos bandas activas y un solo PBI (Figura 1c), a pesar de esto fue evidente 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 solo en tejido de H al inicio de la etapa vegetativa (cuarto muestreo) (Cuadro 1). Por lo que es posible que esta isoenzima tenga una función preponderante durante el proceso de floración de *S. formosissima*.

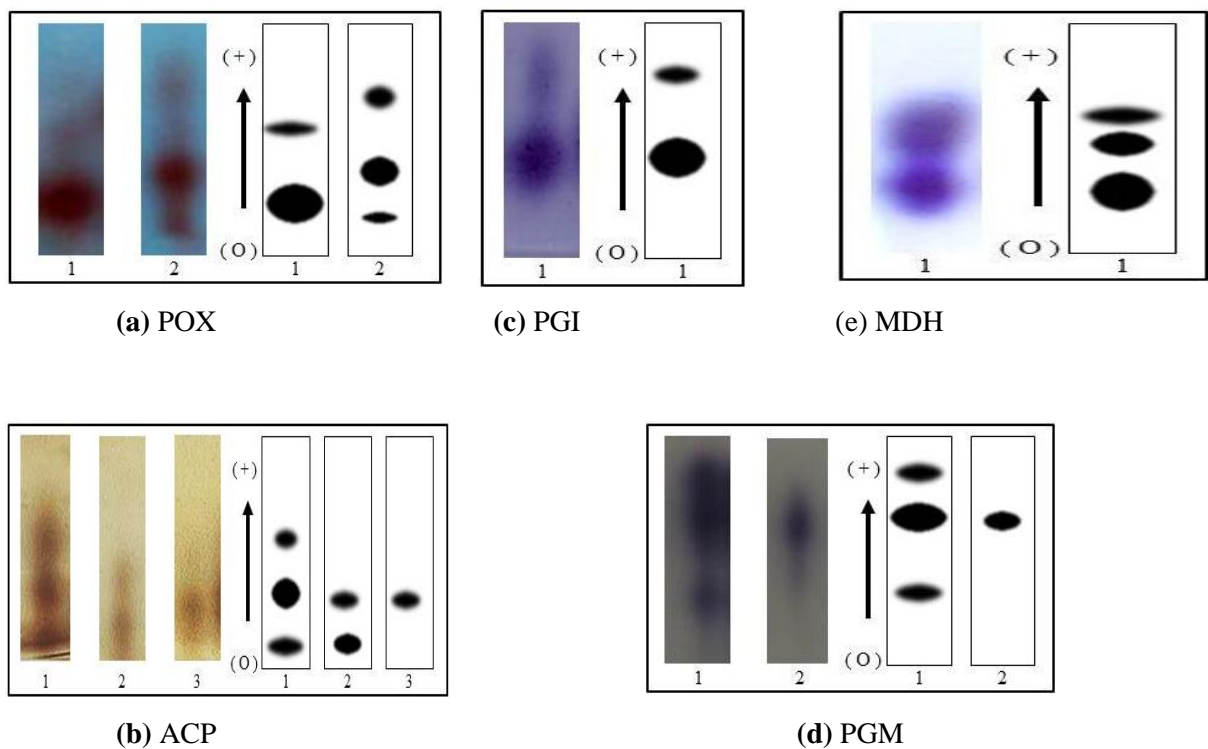


Figura 1. Representación esquemática de los patrones de bandeo isoenzimáticos (PBI) en *Sprekelia formosissima* utilizando marcadores bioquímicos: (a) POX en sistema Tris-citrato pH 7.8, (b) ACP en

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 el Eje “Y” representan el número de patrón de bandeo isoenzimático (PBI); mientras “o” representa el origen de la electroforesis.

Fosfoglucomutasa (PGM)

La PGM participa activamente en el metabolismo de azúcares (Nelson y Cox, 2008), es decir se sabe que cataliza la conversión de glucosa-1 y glucosa-6 fosfato en la síntesis y el consumo de sacarosa. También fue reportado por Mühlbach and Schnarrenberger (1978) 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 el presente estudio, con el sistema PGM se pudo observar expresión diferencial ya que fue posible encontrar 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, sin embargo 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, esto posiblemente por la mayor presencia de cloroplastos que se encuentran en tejido de H.

Malato deshidrogenasa (MDH)

La MDH es una enzima que, dependiendo de su localización subcelular, participa activamente en varios procesos metabólicos como en el ciclo de Krebs, la fotorrespiración, y otras rutas catabólicas y anabólicas (Machado *et al.*, 1993; Nelson y Cox, 2008). En el presente 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 que no se pudo observar expresión diferencial en ambas etapas fenológicas.

No hay una sustancia más importante en los organismos vivos que el DNA, ya que dentro de su estructura está la información hereditaria que determina la estructura de las proteínas las cuales, para su expresión durante el proceso de desarrollo y diferenciación celular se ven involucrados diferentes factores tales 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). Estudios previos han demostrado que las isoenzimas pueden usarse como herramientas en el mejoramiento genético (Arzate-Fernández *et al.*, 2005b). El proceso de expresión diferencial se ha estudiado en algunas especies como el maíz (Scandalios, 1964; Efron, 1970; Rao *et al.*, 1997), tabaco (Stanford y

Galston, 1970), cebada (Pedersen y Simonsen, 1987) y *Brassicca 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*, entre otros.

CONCLUSIONES

Con la técnica de electroforesis horizontal sobre geles de almidón (SGE) fue posible identificar los patrones de bandeo isoenzimáticos diferenciales durante dos etapas fenológicas de *S. formosissima*. Esta técnica, como se describe en el presente trabajo, presenta ciertas ventajas respecto a los marcadores moleculares de DNA, debido a que pueden obtenerse varios geles al mismo tiempo y éstos teñirse hasta con siete enzimas, reduciendo tiempos y costos.

Además, una sola persona es capaz de ensayar varias muestras para las cinco enzimas en 3 horas usando dos cámaras de electroforesis. Por lo tanto, aunque la técnica ya no se considera novedosa, los PBI obtenidos en el presente estudio con los marcadores bioquímicos peroxidasa, fosfatasa ácida, fosfoglucosa isomerasa y fosfoglucomutasa, indican que la técnica es útil para *S. formosissima* y que puede emplearse para estudios de expresión diferencial en ambas etapas fenológicas (vegetativa y reproductiva), así como una herramienta de diagnóstico por ser un procedimiento simple y rápido.

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 UAEM.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

1.- Empleando la técnica de electroforesis horizontal sobre Geles de almidón fue posible determinar la expresión diferencial en *Sprekelia formosissima* (L) Herbert, en la etapa vegetativa y reproductiva.

2- En plantas de lirio azteca, cultivados bajo condiciones de invernadero se pudieron identificar nueve patrones de bandeado isoenzimático.

3.- Con el sistema enzimático MDH no se observó expresión diferencial en la fase vegetativa y reproductiva de *S. formosissima*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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 morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *J. Plant Physiol.* 160(11):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., 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 and Environment* 29: 303-13.

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. *European Journal of Biochemistry* 269: 6278-86.

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. McDonell. 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. *Physiologia Plantarum* 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 (*Oriza 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. Acribia. S.A. Zaragoza, España. pp. 103-127.
- Grierson, D. y S. N. Covey. 1991. *Biología Molecular de las Plantas*. Ed. Acribia. 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. *Journal of Biological Chemistry* 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., B. G. Schubert (eds). *Flora de Veracruz*. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México. 32 p.
- Lozano P. A. 1992. Relación entre el tamaño del bulbo y la floración de *Sprekelia formosissima* (L). *Herb. Tesis de licenciatura UPAEP, Puebla, Puebla.* 46 pp.
- 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). *Biochemical Genetics.* 31: 167-172.

- Marquard, R. D., and Ch. R. Chan. 1995. Identifying Crabapple cultivars by isozymes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120 (5): 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.
- Mühlbach, H. and C. Schnarrenberger. 1978. Properties and intracellular- distribution of 2 phosphoglucomutases from spinach leaves. *Planta* 141: 65–70.
- Nelson, D. L. and M. Cox. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company Corp. 5th Ed. New York:
- Passardi, F., C. Penel and C. Dunand. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Plant Sci.* 9 (11): 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. *Genetics* : 281-285.
- Scragg, A. 2000. *Biotechnología para ingenieros*. Ed. Limusa S. A de C. V. Tercera impresión. España. P. 104.
- 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 Orton, T.J. (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.