



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**PURIFICACION Y EVALUACION
ELECTROFORETICA DE LAS
PROTEINAS DE CLONES DE
Hevea brasiliensis**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

PAULINA LARA CALDERON



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

- RESUMEN	1
- OBJETIVO	2
- INTRODUCCION	3
- MATERIALES Y METODOS	19
- DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
- RESULTADOS	34
- DISCUSIONES	44
- CONCLUSIONES	55
- BIBLIOGRAFIA	57

RESUMEN

1

Dado que las proteínas son un producto directo de la transcripción y traducción de genes, sirven de documentos que contienen la información del genotipo e historia de los organismos, la cual puede ser " leída " al caracterizar a las proteínas individuales con métodos analíticos, como la electroforesis en gel.

Dicho método se utilizó en este trabajo para conocer al conjunto de proteínas presentes en el látex de Hevea brasiliensis , algunas de las cuales constituyen el sistema que aseguran la transformación de sacarosa a hule, con el objeto de establecer patrones electroforéticos característicos que correspondan a clones específicos.

Los patrones electroforéticos obtenidos fueron casi idénticos entre los clones estudiados, por lo que no se encontró la relación esperada entre dichos patrones y el potencial productivo de cada clón.

El presente trabajo pretende estandarizar el método de electroforesis en gradiente en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, PAGGE-SDS, para establecer una relación cualitativa entre las proteínas contenidas en el látex fresco y el potencial productivo de diferentes clones del árbol del hule, Hevea brasiliensis, con el fin de poder seleccionar anticipadamente árboles que prometan tener una alta productividad de látex y más específicamente de hule, de contribuir a los programas de selección y mejoramiento genético de este cultivo, así como de su propagación para cubrir las necesidades futuras de hule natural del país.

La principal fuente de hule natural en el mundo es la de Hevea brasiliensis, que es un árbol que puede ser " sangrado " de manera continúa, la composición de su látex permite un tratamiento del hule más fácil y su producción neta es superior a todas las demás especies vegetales productoras de hule conocidas.

El árbol del hule Hevea brasiliensis Muell Arg., pertenece a la familia Euphorbiaceae, subfamilia de las Crotonoideas y a la tribu Acalyphae, es nativo de la cuenca baja del río Amazonas, donde se inició su explotación a fines del siglo XVIII hasta 1876. Fué en junio de este año cuando Wickham, un inglés propietario de plantaciones que entonces vivía en Brasil, reunió 70,000 semillas de Hevea a lo largo del río Tapajoz y las embarcó a Kew, de éstas se obtuvieron 2,400 plantas que fueron distribuidas a Ceilán, Java Occidental y Malaya(1). Posteriormente se llevaron a todas las regiones tropicales cálido-húmedas, para establecer plantaciones ordenadas, pero es en el trópico asiático donde se ha logrado el máximo desarrollo tecnológico.

En México, el establecimiento del cultivo del hule se realizó desde el año 1882, cuando las compañías inglesas y holandesas establecieron las primeras plantaciones. El material vegetativo usado es probable que haya procedido de las Indias Orientales Holandesas, hoy Indonesia. Sin embargo estas primeras plantaciones fueron abandona-

das a partir de 1910, como consecuencia del movimiento revolucionario que convulsionó al país.

A partir de 1940 se iniciaron trabajos para propagar y seleccionar material vegetativo de alto rendimiento, en el Campo Agrícola Experimental " El Palmar " (CAEPAL), situado en el municipio de Tezonapa, Ver., con la introducción de numerosos clones de origen oriental, procedentes de estaciones experimentales similares a la de " El Palmar ", situadas en Honduras y Costa Rica. A partir de 1964 se han introducido clones procedentes de la Sociedad Indochina de Plantaciones de Hevea, de Saigón, Vietnam del Sur; de la Estación Experimental de Los Brillantes, de Retalhuleu, Guatemala y del Instituto Agronómico del Norte, de Pará, Brasil (2).

El CAEPAL cuenta con una superficie de 315 hectáreas para sus trabajos de investigación y se localiza a 16 kilómetros aproximadamente de Tezonapa; su altura sobre el nivel del mar es de 180 metros, su localización geográfica es a los 18°32' de latitud norte y a los 90°47' de longitud oeste, la precipitación media anual va de los 2,000 a 4,000 milímetros y la temperatura media anual es de 27°C. La clasificación de los suelos y el tipo de vegetación predominante en ellos es la siguiente: suelos latosólicos, con selva alta perennifolia de Terminalia amazonia; suelos de rendzina con selva alta subperen-

nifolia de Brosimum alicastrum y los suelos hidromórficos con selva de Scheelea liebmannii (3).

Las condiciones climáticas generales para el desarrollo del hule son las siguientes :

- latitud. - entre los 12 ° tanto al norte como al sur del ecuador.
- altitud. - de los cero a los 500 msnm.
- temperatura media anual. - entre los 23 y 28 ° C.
- precipitación media anual. - de 2,500 a 4,000 mm.
- suelos. - rojos lateríticos, de origen volcánico y los aluviales, hidromórficos no inundables, sino profundos, bien drenados, fértiles y muy porosos.
- viento. - en lugares donde no sobrepasen los 40 nudos (90 km) por hora o sea que no alcancen una fuerza de diez en la escala de Beaufort.
- luminosidad. - es preferible que tengan de cinco a ocho horas de luz.

DESCRIPCION BOTANICA.

El Hevea es un árbol de tamaño mediano, de 10 a 20 metros de altura, con ramitas robustas, lisas y que contienen mucho jugo lechoso. El peciolo es delgado, verde y de 3.5 a 30 cm de largo. Las hojuelas son de tamaño corto y elípticas-oblongas u obovadas-oblongas; la base es angosta y aguda; el ápice es acuminado; las ho-

juelas individuales son enteras, pinatinervadas, de color verde obscuro en la parte adaxial, de color más claro y glaucas en la abaxial, de 5 a 35 cm de largo y de 2.5 a 12.5 cm de ancho. La inflorescencia es axilar y lateral, con tallo, laxa en forma de panícula, de muchas flores y con pubescencia corta. Las flores son unisexuales-monóicas, pequeñas y de color amarillo claro. El cáliz es campanulado con cinco segmentos triangulares angostos. En la flor masculina hay diez estambres connatos que forman una columna con las anteras en dos hileras superpuestas. Existe un pequeño disco peludo, de cinco lóbulos. Las flores femeninas son más grandes, el ovario es corto, pubescente y de tres celdas con tres estigmas cortos, gruesos y sésiles. Los frutos son grandes, comprimidos, trilobados obtusos, rara vez con cuatro a seis lóbulos, de 3 a 6 cm de diámetro y separándose en tres, cuatro o seis bayas de dos valvas; el pericarpio es coriáceo, el endocarpo leñoso. Las semillas son grandes cuadrangulares-ovoides, comprimidas en uno o dos lados, brillantes de color grisáceo o pardo pálido, con puntos y manchas irregulares de color pardo oscuro y son de 2 a 3.5 cm de largo, de 1.5 a 3 cm de ancho y de 1.5 a 2.5 cm de grueso (4).

MEJORAMIENTO Y SELECCION DEL CULTIVO DEL HULE.

La gran variabilidad morfológica existente entre las nueve especies conocidas de Hevea ha sido aprovechada debido a que todas las especies tienen el mismo número de cromosomas, $2n = 36$; con el fin de incluir por medio de un gran número de cruas, en la especie con mayor producción los caracteres de resistencia a enfermedades y otras características agronómicas deseables. Del mismo modo, la variabilidad que existe en las plantaciones, entre árboles individuales, es explotada para mejorar el cultivo del hule.

Los individuos que prometan tener, entre otras características, un buen potencial productivo son seleccionados y propagados vegetativamente, con el fin de que toda la descendencia asexual del individuo, es decir el clón, sea genéticamente idéntica y reproduzca las propiedades deseables.

La selección se inicia con el aislamiento de los árboles de mejor rendimiento en las plantaciones de árboles de semilla. Los árboles progenitores primarios son propagados vegetativamente y los injertos de yema se plantan en pruebas de clones. Los clones sobresalientes son liberados para su plantación comercial o se multiplican para pruebas posteriores o para mejoramiento. El programa de mejoramiento puede consistir en polinizaciones manuales de los árboles progenitores primarios o clones, con el fin de combinar diversas ca-

racterísticas esenciales, tales como la resistencia al daño por el viento, enfermedad parda de la corteza, etc. La descendencia se prueba y se hacen selecciones para árboles progenitores secundarios o familias de plantas obtenidas por semilla.

Los clones recomendables para establecerse en el CAEPAL son : IAN-710, RRIM-527, RRIM-614, TJR-1, GA-49, GA-1126, GA-1279, GV-21, GV-31, GV-42, GA-26, las series México, Mex-17, Mex-22 y Mex-23 (5).

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron los clones IAN-710, GV-31 y GV-42. Entre sus características (tabla 1) IAN-710 y GV-31 son los mejores productores de hule seco, tienen mayor adaptabilidad y son de fácil propagación en el CAEPAL.

EL LATEX.

El árbol de Hevea brasiliensis Muell Arg., tiene un complejo sistema laticífero que se desarrolla de células ordinarias en la corteza por la disolución gradual de sus paredes extremas y la pérdida del contenido celular. Ellas forman reticulaciones complejas dispuestas en cilindros verdaderos más o menos concéntricos que son más abundantes cerca del cámbium y se diseminan hacia la periferia (fig. 1). Estas células tienen funciones especiales; además de los

	IAN-710	GV-31	GV-42
Progenitores	F 409 X PB 86	clón primario	clón primario
Producción 1982 kg hule seco / ha / año.	1,280	808	860
Producción 1983 kg hule seco / ha / año.	1,376	707	760
Tallo	recto y muy robusto	recto	recto y robus- to.
Corteza	café, suave y lisa	regular y gruesa	café, muy sua- ve.
Injertos: a) tiempo para ini- ciar se explotación.	de 5 a 7 años	_____	de 9 a 10 años.
b) forma de la co- pa	triangular	amplia y di- fusa.	cónica y alta

elementos clásicos : núcleo, mitocondrias, ribosomas, etc., contienen un gran número de partículas de hule, estructuras tipo plástidos: partículas Frey Wyssling y microvacuolas lisosomales o lutoideas (6).

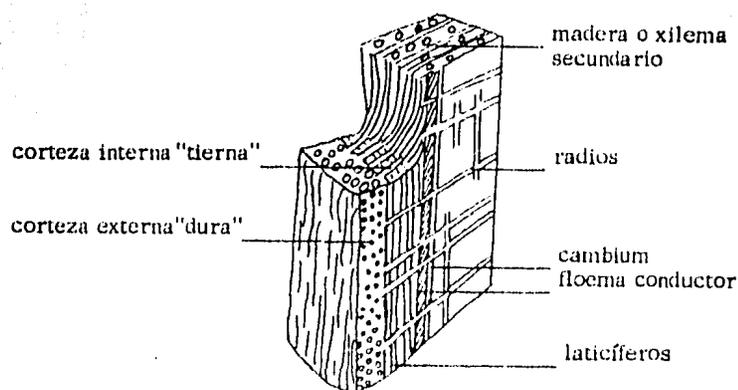


Figura No. 1 Organización general de la corteza de Hevea brasiliensis a nivel de la muesca (7).

El látex fresco se puede considerar un verdadero citoplasma, consiste de una suspensión coloidal de partículas de hule en un suero acuoso. El contenido de hule varía de 25 a 40 por ciento, otros constituyentes en el látex incluyen proteínas, resinas, azúcares, glucósidos, taninos, alcaloides y sales minerales. Su composición varía cuantitativamente entre árboles, clones, suelos, condiciones de riego, clima y muestras tomadas en diferentes estaciones del año. Estudios analíticos han demostrado que el látex fresco contiene cerca de 1 % de

proteína, parte de la cual esta adsorvida en la superficie de las partículas de hule, mientras que el resto esta distribuida entre la fase de suero acuoso del látex y los cuerpos lutoides (8).

Por su constitución, el látex colectado puede ser separado por centrifugación en tres fracciones principales : una capa superior blanca de partículas de hule; un suero acuoso, que es la fuente de material protéico, y una fracción de fondo o sedimento que contiene las partículas lutoides descritas por Homans y Van Gils (9).

Cosecha . -

La recolección del látex se debe iniciar aproximadamente a las once de la mañana. La cosecha se realiza mediante el sistema de pica o " sangrado ", ésta se inicia cuando el árbol ha alcanzado una circunferencia de 50 cm; se escoge el tablero de pica o sea la sección del árbol en explotación a una altura de 1.25 metros del suelo. La inclinación del corte de pica se deberá realizar en espiral descendente de izquierda a derecha, en ángulo de 30 a 35 grados con respecto a la horizontal, de esta manera se cortarán más tubos laticíferos que darán por resultado una mayor producción. El método de pica que hasta ahora ha dado mejores resultados es el de semiespiral cada tercer día ($S2/ D/2$). El grosor de la corteza cortada por cada pica deberá ser de 1.5 a 1.7 mm , suficiente para seccionar los vasos laticíferos y verter el látex.

EL HULE.

Este importante polímero es producido por un gran número de plantas, principalmente las que pertenecen a la familia Euphorbiaceae como es el caso de Hevea brasiliensis.

Del total de materia seca, que es de un 25 a un 45 %, presente en el látex, el 90 % consiste de polisoprenos de configuración " cis ". La biosíntesis de hule en el tejido laticífero es la principal ruta metabólica involucrada en la regeneración de látex entre dos sangrados.

La sacarosa, producto de asimilación fotosintética, es transportada a los laticíferos, lugar de síntesis del hule, ya que es la molécula inicial de dicha síntesis (fig. 2). La sacarosa es primero catabolizada por glicólisis para dar moléculas de piruvato, energía en la forma de ATP y cofactores reductores en la forma de NAD(P)H. Las moléculas de acetil coenzima-A producidas son anabolizadas hacia isopentenil-pirofosfato (IPP) que asociadas enzimáticamente forman grandes cadenas poliméricas de cis-polisoprenos (5) (fig. 3).

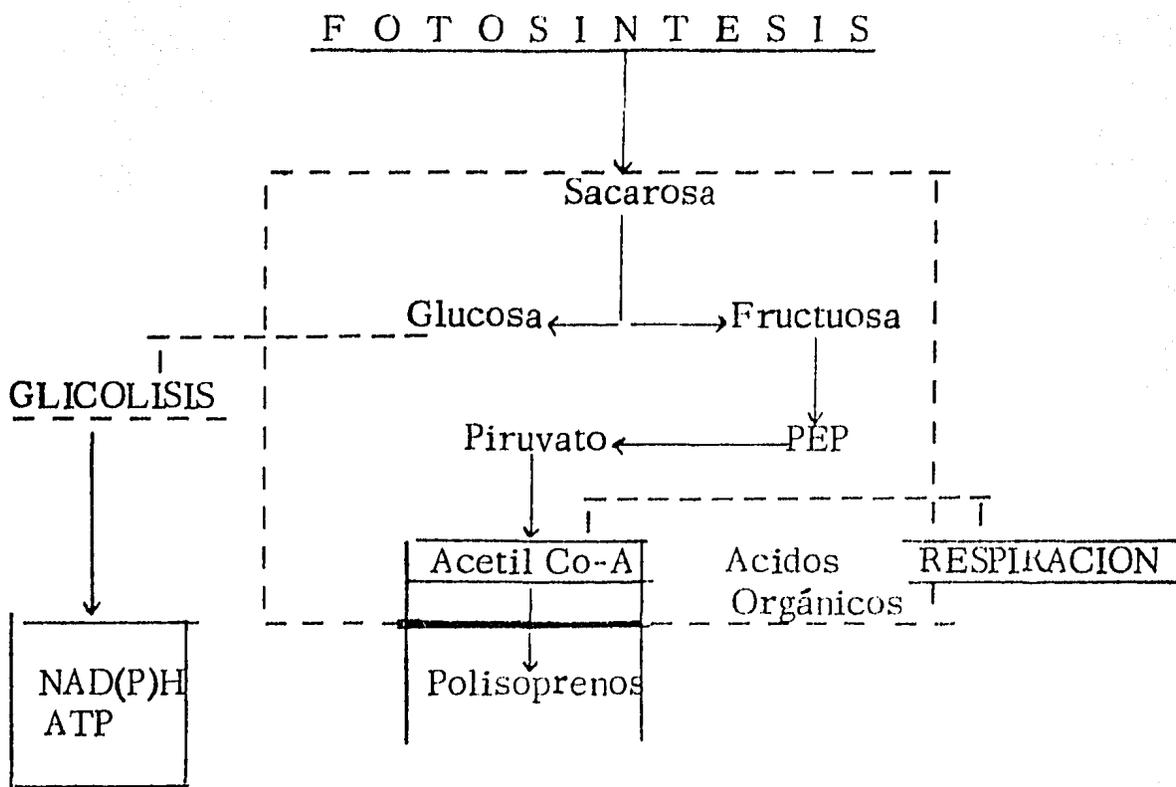


Figura No. 2 Interrelaciones entre la degradación de carbohidratos y la síntesis de hule(10).

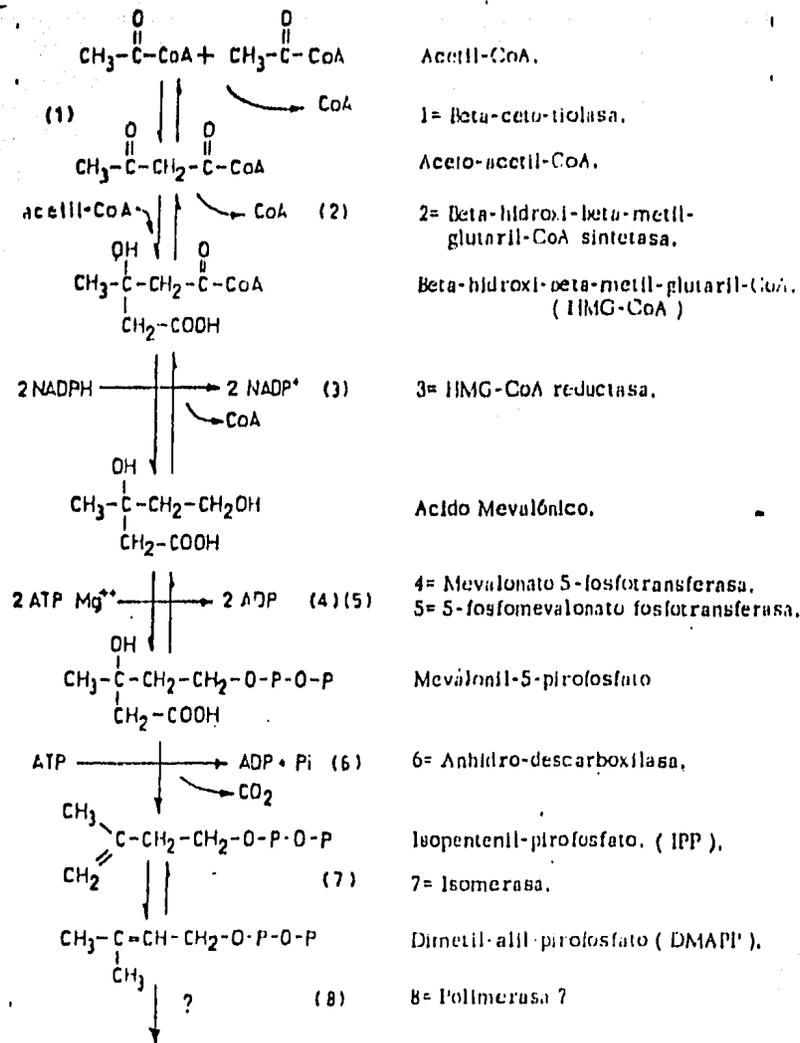


Figura No. 3 Biosíntesis de isoprenoides.

PERSPECTIVA DEL HULE NATURAL.

El hule natural, al igual que muchas otras materias primas, constituye un producto de exportación importante para algunos países subdesarrollados (tabla II), que se ven en la necesidad de exportarlo por no contar con la infraestructura adecuada que le permita transformarlo en diversos productos manufacturados; los principales consumidores de hule natural son por lo tanto los países industrializados (11).

Por otro lado, a partir de 1950, el hule sintético derivado del petróleo ha venido desplazando del mercado mundial al hule natural en cuanto a sus usos finales, como son llantas, industria eléctrica, calzado, empaques, pinturas, etc., debido a la fuerte investigación encaminada al desarrollo de diversas variedades sintéticas que cumplen con ciertas características del hule natural.

Por el efecto de la competencia entre ambas clases de hule, el precio del hule esta más supeditado a los precios del hule sintético y éste a su vez a los precios del petróleo, que a sus características particulares que anteriormente le hacían más competitivo. Los precios del hule natural han aumentado brutalmente de 1972 a la fecha, en que han llegado por arriba de los precios del hule sintético, lo que tiene como consecuencia que el porcentaje de hule natural consumido en el mundo del total del hule, bajara de 61.92 % en 1958 a 30.43 en 1973 y que pa-

ra 1980 (tabla III) se continuara consumiendo grandes cantidades de hule sintético.(12).

Tabla II

	1980	
	Producción Ton. métricas	Exportación neta Ton. métricas
Malasia	1,552,245	1,483,027
Indonesia	1.020,000	976,131
Tailandia	501,109	456,803

Tabla III

	1980	
	Consumo total Ton. met.	% de hule sintético
E. U. A.	2,565,000	77.19
Japón	1,312,000	67.45
R. F. A.	600,997	70.10

Otro factor que afecta la competencia entre ambas clases de hule es el hecho de que la producción de hule natural, por ser un producto agrícola, es influenciada por factores externos al control de los productores y a que la producción es retrasada de cinco a siete años, que es el lapso que hay que esperar para iniciar la explotación del árbol, pudiendo ocurrir durante este tiempo un cambio en las condiciones del mercado. En contraste, el hule sintético, como producto manufacturado, permite al productor una flexibilidad de producción en términos cuantitativos y cualitativos para poder controlar la producción en respuesta a las altas y bajas en la demanda y que le permite permanecer al margen de la inestabilidad del mercado mundial, como es el caso del hule natural y otras materias primas de origen agrícola.

Como respuesta a esta competencia, los productores de hule natural han echado a andar programas extensivos de producción y selección de plantas para poder aumentar la productividad cuantitativa y cualitativamente para poder tener precios más competitivos, pero sobre todo para satisfacer los requerimientos de hule para el futuro ya que el aprovisionamiento en petróleo será cada vez más difícil. Así el futuro del hule natural está garantizado, por ser éste un recurso natural renovable y por ser una industria natural de poco consumo de energía.

IMPORTANCIA ECONOMICA NACIONAL DEL HULE NATURAL .

La superficie de Hevea brasiliensis actualmente en producción es de 4,300 hectáreas de las 12,435 hectáreas plantadas (13), distribuidas en Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Chiapas, no alcanza a satisfacer las demandas de la industria nacional, la cual requirió en 1982 de una importación equivalente a 50,941 toneladas de látex de Hevea y de hule natural que significó una fuga de divisas de aproximadamente 46,897,561 dólares (14); las plantaciones nacionales contribuyen sólo con aproximadamente un cinco por ciento de la demanda. La producción por hectárea es en promedio de una tonelada por año.

Es pues importante incrementar los estudios y el apoyo económico necesarios para desarrollar el cultivo del hule, al seleccionar y propagar material vegetativo de alto rendimiento para cubrir las necesidades futuras del país.

Además, a nivel regional el cultivo de hule tiene gran importancia económica y social ya que Hevea brasiliensis es uno de los cultivos perennes mejor remunerados.

MATERIAL BIOLÓGICO - el látex fué colectado de varios individuos por cada clón de Hevea brasiliensis del Campo Experimental " El Palmar " (CAEPAL), situado en el municipio de Tezonapa, Ver.

CENTRIFUGACION - el látex se centrifugó en tubos de polialómero en una centrífuga Beckman L-2 H.V. en un rotor número 30.

DIALISIS - la muestra a dializar se colocó en tubos de diálisis de celofán, con una canica adentro y se puso en un aparato de diálisis contínuo (15). Dicho aparato tiene un movimiento tal que permite que la canica se desplace dentro del saco de diálisis y éste dentro del mismo aparato, provocando la agitación contínua de la muestra. La solución empleada para provocar el fenómeno de difusión se esta renovando constantemente. El aparato esta rodeado por un tubo de enfriamiento que se alimenta con un refrigerador de agua Sargent 84-890.

LIOFILIZACION - el material a secar o concentrar se colocó en un matraz bola de vidrio donde ocupa aproximadamente el 10 % de su capacidad. Primero se congeló por inmersión en acetona y hielo seco distribuyéndolo por rotación en la mayor superficie posible de la bola para que la capa congelada fuera delgada y homogénea, posteriormente se colocó en el liofilizador (EF4 Modulyo Freeze Dryer, Edwards) conectado a una bomba de vacío, la temperatura de condensación del apa-

rato se mantuvo a -55°C .

DETERMINACION DE PROTEINAS - se siguió el método descrito por Lowry (16) que emplea el reactivo de Folín-Ciocalteu. Este reactivo reacciona con las proteínas dando un complejo colorido. El color es debido a la reacción entre los enlaces peptídicos y el ión cúprico en solución alcalina y a la reducción del reactivo fosfomolibdico fosfotúngstico por la tirosina y el triptofano presentes. Así, la intensidad del color dependerá de la cantidad de estos aminoácidos aromáticos. La concentración de proteína de una solución desconocida se estima por comparación con una curva estándar de albúmina.

CROMATOGRAFIA EN GEL - este método de separación de sustancias de acuerdo a su tamaño y forma molecular se logra por el uso de un tamiz molecular.

El material comercial usado para la cromatografía fué el Ultrogel AcA - 44 que se empacó en columnas cromatográficas de LKB-Produkt. Para llevar a cabo la filtración se utilizó además, una bomba Varioperpex II, un colector de fracciones Ultrorac II, un espectrofotómetro Uvicord S y un registrador de dos canales (todos LKB); estos aparatos instalados, excepto el registrador, dentro de un refrigerador 2203 Minicoldlab.

El Ultrogel AcA 44 (4 % de acrilamida y 4 % de agarosa) tiene un intervalo de fraccionamiento que va de 10,000 a 130,000 daltones, es estable en intervalos de pH 3 y 10 y a temperaturas de 2 ° a 36 ° C (17).

Antes de empacar el gel en la columna debe ser suspendido en agua destilada y sometido a vacío agitando esporádicamente durante 30 minutos para eliminar el aire atrapado en los poros del gel.

El volumen total del gel (V_t) se puede calcular multiplicando la altura deseada del gel por el área de la misma columna, $V = a \cdot h$; un método más preciso es medir el volumen con agua antes de empacar con el gel la columna. El volumen de exclusión o volumen externo (V_o) de los geles en filtración, se determina al pasar por la columna, antes de inyectar la muestra, Dextrana-azul 2,000 que tiene un peso molecular promedio de 2×10^6 daltones por lo que no penetra dentro de las partículas de gel sino que son eluidas bajo la forma de zonas afiladas.

La Dextrana - azul 2,000 es un polímero de D-glucopiranososa sintetizado a partir de sacarosa por un gran número de bacterias pertenecientes a la familia Lactobacilae, al cual se le ha introducido un grupo cromóforo policíclico que permite observar directamente su desarrollo a través de la columna y juzgar la calidad del empacamiento y homogenización del gel.

El volumen de elución (V_e) es el volumen de solvente necesario para la transferencia de la muestra desde la entrada a la salida de la cama del gel.

ELECTROFORESIS EN GRADIENTE - la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, PAGE-SDS, en gradiente, produce una alta resolución de subunidades de proteínas con un intervalo muy amplio de pesos moleculares, desde 1×10^4 hasta 1×10^6 daltones.

El gradiente empleado, por sus simplicidad, fué el lineal aunque con el exponencial se pueden separar proteínas con un intervalo más amplio de pesos moleculares. Para producir el gradiente se colocan las soluciones concentrada y diluida en el aparato formador de LKB (18).

Los geles de poliacrilamida tienen un gradiente continuo de concentración ascendente de acrilamida y por lo tanto decreciente en el tamaño de los poros, cuyos límites són cinco y quince por ciento, que se preparan al mezclar los siguientes reactivos en las cantidades anotadas :

Mezcla de acrilamida	5 %	15 %
solución madre de acrilamida	6.6 ml	20.0 ml
amortiguador del gel de resolución	5.0 "	5.0 "
SDS al 10 %	0.4 "	0.4 "
Persulfato de amonio al 1.5 %	0.93 "	0.93 "
agua	27.0 "	10.0 "
sacarosa (6.0 g)	---	3.33 "
TEMED	13.3 μ l	13.3 μ l

Solución madre de acrilamida- se preparó con 30 gramos de acrilamida y 0.8 gramos de bis- acrilamida en un volumen total de 100 ml de agua. En los resultados, la concentración de acrilamida y bis-acrilamida (AbA) se utiliza como % de T(19).

El tamaño efectivo del poro esta grandemente influenciado por la concentración total de acrilamida en la mezcla de polimerización y la presencia de bis-acrilamida hace que la gelificación ocurra entre grandes cadenas de polímeros que se entrecruzan a intervalos para formar enlaces covalentes.

Sistema amortiguador discontinuo- es el que emplea diferente composición y pI entre el amortiguador del gel de resolución y el de electrodos :

Amortiguador del gel de resolución. - Tris-HCl 3.0 M; pH=8.8 .

Amortiguador de electrodos. - Tris 0.025 M, Glicina 1.92 M;
pI=8.3 ;

en este sistema la muestra se coloca sobre un gel concentrador de po-

ros grandes, polimerizado encima del gel de resolución y tiene la ventaja de que se pueden aplicar grandes volúmenes de muestra y se obtiene una buena resolución de los componentes de la misma.

Sistema persulfato de amonio-TEMED - la polimerización es acelerada en presencia de estos catalizadores; el TEMED cataliza la formación de radicales libres del persulfato y éstos a su vez inician la polimerización.

Sacarosa- le da estabilidad al gradiente ya que " amortigua " las corrientes de convección que se forman durante la polimerización.

Gel concentrador- los reactivos utilizados para este gel son los siguientes :

	ml de solución
solución madre de acrilamida	2.5
amortiguador del gel concentrador	5.0
persulfato de amonio al 1.5 %	1.0
SDS al 10 %	0.2
agua	11.3
TEMED	0.015

Amoriguador del gel concentrador. - Tris-HCl 0.5 M; pH=6.8

Sistema amortiguador disociante - sistema diseñado para disociar proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales. El agente disociante más comunmente usado es el detergente iónico SDS.

La mezcla protéica se disuelve en el amortiguador de la muesu

tra - Tris-HCl 0.0625 M; pH=6.8 - y es desnaturalizada calentando a 100 ° C durante dos minutos con un exceso de SDS y de un agente reductor tiólico como el 2-Mercaptoetanol para romper las uniones disulfuro. La mayoría de los polipéptidos unen SDS en una relación de peso constante de 1.4 g de SDS por gramo de polipéptido; queda así una densidad de carga idéntica en el complejo. Dicho complejo migra en los geles de poliacrilamida de porosidad correcta estrictamente por su tamaño molecular debido a que su carga eléctrica es idéntica por la presencia del SDS. La solución de la muestra contiene también azul de bromofenol como indicador frontal de la electroforesis y sacarosa para que la muestra permanezca en el fondo del pozo del gel concentrador al ser colocada. Para formar el gradiente del gel de poliacrilamida se siguió el método descrito por Hames, B. (20).

DENSITOMETRO (LKB 2202 Ultrosan Laser Densitometer) - este método ha sido utilizado con el fin de visualizar, registrar y evaluar los resultados electroforéticos cuantitativa y semicuantitativamente. Para distinguir entre el número e intensidad de las bandas se utiliza como fuente de luz un rayo laser de HeNe fino, intenso y monocromático, su longitud de onda es de 633 nm que puede penetrar en las bandas de proteína densamente teñidas para ser medidas con exactitud por un fotodetector y registradas en un graficador.

El látex de los clones IAN-710, CV-31 y GV-42 se trabajó bajo las mismas condiciones experimentales. Se recolectó aproximadamente a las once de la mañana, 1 litro de cada uno, en recipientes perfectamente limpios y se trasladó al Instituto de Química de la UNAM en botellas de vidrio dentro de termos con hielo, sin congelar y sin añadir ningún anticoagulante, a donde llegó 24 horas después de haber sido colectado.

El látex se centrifugó durante 50 minutos a 74,000 x g, a una temperatura promedio de 8 °C ; se separó en las siguientes fracciones (fig. 4) :

- a) una capa superior, con consistencia sólida, de color blanco marfil correspondiente al hule.
- b) adherida a ésta se encuentra una capa delgada de color anaranjado.
- c) solución semitransparente que corresponde al suero.
- d) residuo sólido que queda en el fondo del tubo.

El hule se retiró y el suero se decantó o se separó con una pipeta Pasteur para centrifugarlo de nuevo bajo las mismas condiciones. En algunos casos se centrifugó más de dos veces con el fin de obtener el suero libre, o casi libre, de partículas de hule y de las porciones b y d.

El suero de cada clón se congeló y liofilizó, posteriormente se le determinó proteínas por el método de Lowry.

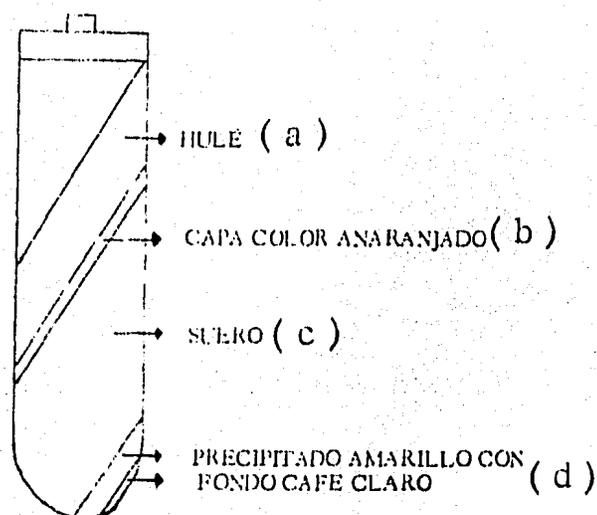


Figura No. 4 ZONAS DEL LATEX OBTENIDAS DESPUES DE CENTRIFUGAR.

El suero liofilizado se sometió a cromatografía de permeación en Ultrogel AcA 44. Las muestras se reconstituyeron con el amortiguador Clark and Lubs, pH 6.9 (21), que se utilizó también para estabilizar y calibrar la columna y para llevar a cabo la cromatografía. La concentración de las muestras fué de 70 mg/ml (ya que nos interesaba obtener de cada fracción una cantidad suficiente para los siguientes experimentos, más que la calidad de la separación entre las fracciones), las cuales se filtraron por celita para eliminar el material insoluble.

Cada muestra filtrada se introdujo a una columna cromatográfica de las siguientes dimensiones : Area = 5.3 cm^2 ; Altura = 100 cm y Volumen total = 530 cm^3 . El volumen ocupado por el gel en la

columna fué 421.4 cm^3 . La velocidad del flujo fué de 0.327 ml/min y el volumen de cada tubo colectado correspondió a 6.1 ml ; la temperatura se mantuvo a 10°C . La absorbancia del eluyente se leyó a 206 nm mediante un espectrofotómetro acoplado a un registrador. El rango de absorbancia utilizado fué de dos y la velocidad del papel se fijó a 0.5 mm/min . Para obtener el volumen de exclusión la columna se calibró con Dextrana - azul a una concentración de 2.3 mg/ml ; el V_0 fué de 164.7 ml .

Los tubos o fracciones obtenidos de cada clón se dividieron y reunieron en cinco partes: I, II, III, IV y V, numerándose por orden de elución. La separación se hizo aproximadamente igual para los tres clones con base en la absorbancia del eluyente y a un volumen determinado (figs. 5, 6 y 7).

Cierto volumen de las fracciones se dializó contra agua destilada durante 18 hrs a 4°C , con un flujo constante de intercambio de agua destilada y con agitación continúa. Posteriormente se congelaron y liofilizaron. A las tres fracciones no dializadas se les determinó proteínas por el método ya mencionado.

Para una comparación preliminar de la variabilidad proteínica en el látex de los clones, el suero total de cada clón se separó por electroforesis (PAGGE)-SDS en geles de acrilamida con un gradiente

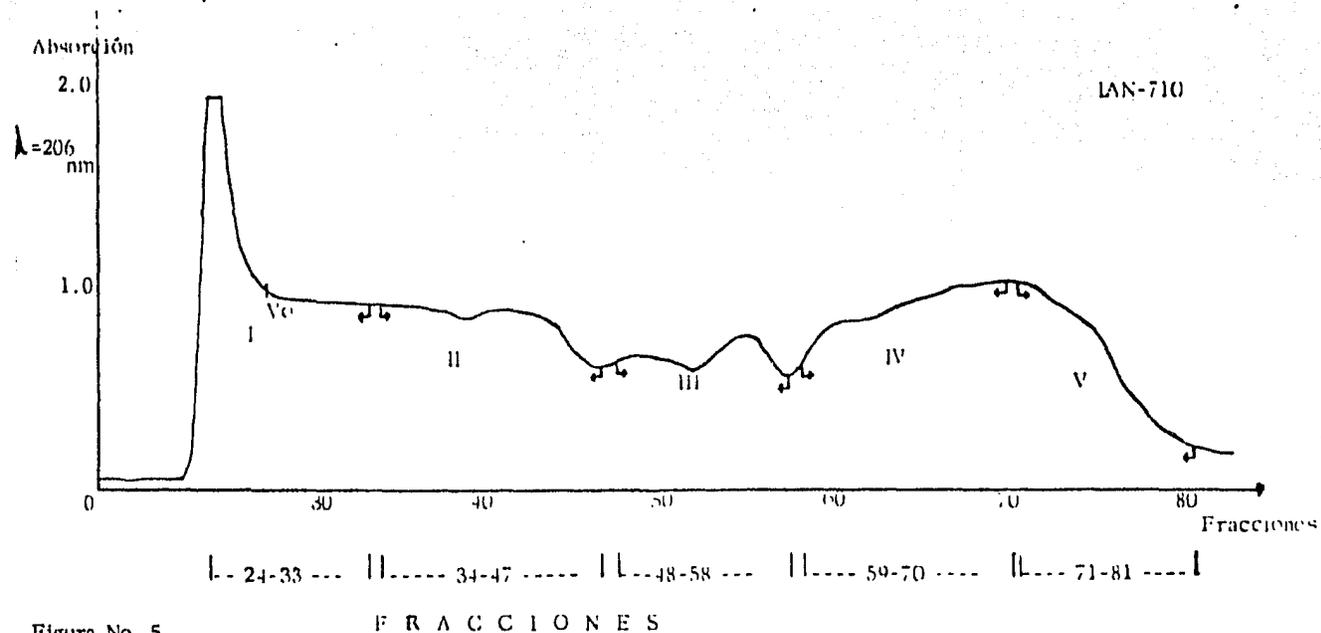


Figura No. 5
 Separación por filtración en gel Aca 44 de LAN-710; el volumen (ml) correspondiente a cada fracción es la siguiente: I = 61 ; II = 85.4 ; III = 67.1 ; IV = 79.1 y V = 67.1 . El V_e fué de 487.0 ml.

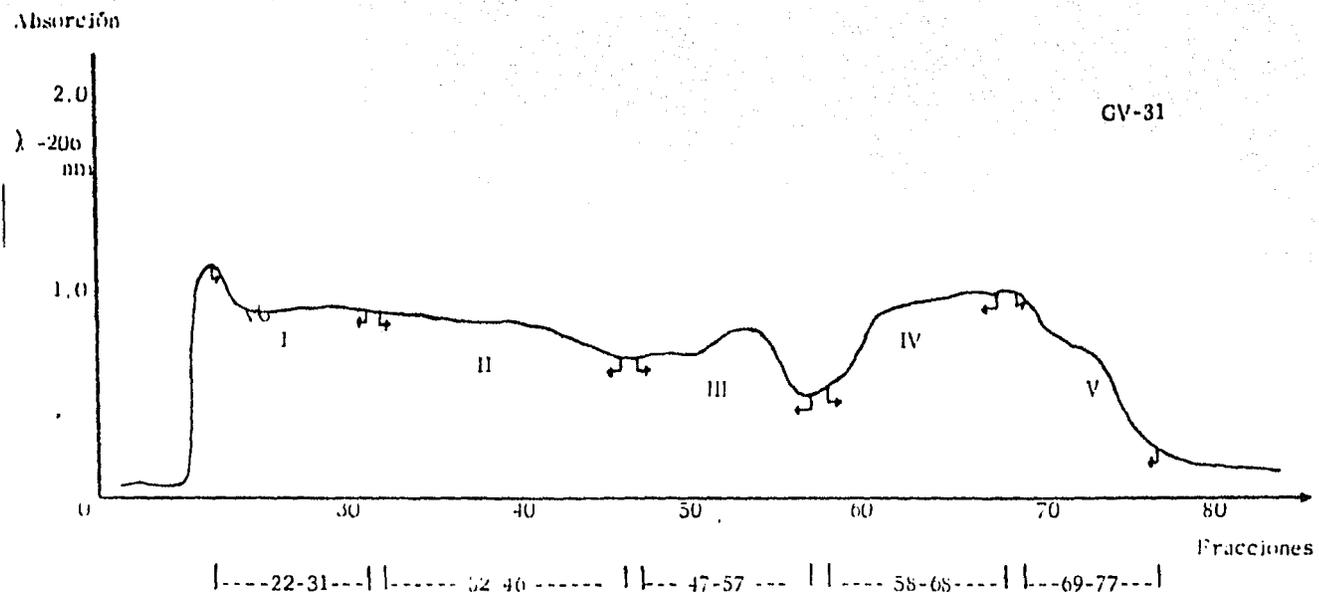


Figura No. 6

F R A C C I O N E S

Separación por filtración en gel AcA 44 de GV-31 ; el volumen (ml) correspondiente a cada fracción es la siguiente : I = 61 ; II = 91.5 ; III = 67.1 ; IV = 67.1 y V = 54.9 . El V_e fué de 569.6 ml.

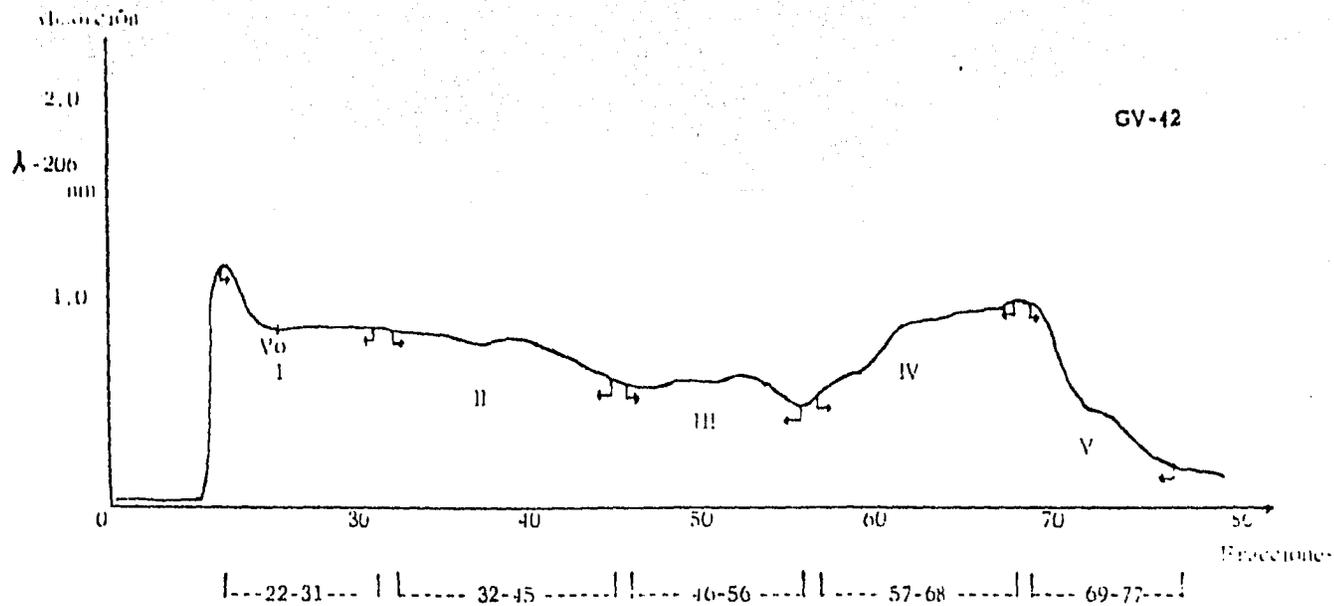


Figura No. 7

Separación por filtración en gel Aca 44 de GV-42; el volumen (ml) correspondiente a cada fracción fué la siguiente : I = 61 ; II = 85.4 ; III = 67.1 ; IV = 79.1 y V = 54.9 . El Ve fué de 475.8 ml.

de 5 a 15 %. Dado que las muestras no presentan el mismo contenido de proteínas, se ajustó igualando la concentración de proteínas de cada clón: IAN-710, 10 mg/0.5 ml ; GV-31, 12 mg/0.5 ml y GV-42,14 mg/0.5 ml. Las condiciones del corrimiento fueron 80 miliamperes constantes, de 0.2 a 0.6 kilovoltios y una temperatura de 15 °C.

Sin embargo, la mayoría de los experimentos se hicieron con las fracciones I, II y III de cada clón en PAGGE-SDS. El gradiente formado fué también de 5 a 15 % (posteriormente se encontró que el gradiente óptimo para la fracción I es de 4 a 9 % y para la II de 8 a 15 %) y las condiciones de corrimiento fueron las mismas. Las mejores concentraciones encontradas para cada fracción fueron 7 mg/0.4 ml para la I; 8 mg/0.4 ml para la II y 6 mg/0.3 ml para la III. El volumen total colocado en el gel fué de 20 a 25 μ l de cada una.

Para el análisis de variación electroforética los resultados se interpretaron a partir de los registros densitométricos, ya que con este método se pueden detectar desde bandas intensamente teñidas hasta las poco teñidas, así como distinguir entre una banda y otra.

Los datos también se compararon por métodos estadísticos : análisis de varianza para un arreglo experimental doble, en el que se utilizó el paquete estadístico de la calculadora programable Hewlett-Packard (HP-97), con el fin de evaluar la variación proteínica entre

IAN-710, GV-31 y GV-42 y a la vez la variación interna de cada clón debida a la longitud de los geles.

Posteriormente, para evaluar el error experimental dentro de cada clón en geles distintos se obtuvieron diferentes medidas de dispersión : desviación estándar, coeficiente de variación, error estándar medio y sesgo.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS TOTALES .

Los resultados de las electroforesis (PAGGE-SDS) de las proteínas totales del suero dializado se muestran en la fotografía No. 1, donde aparecen los tres clones con un gran número de bandas protoméricas bien separadas.

Los geles con los patrones electroforéticos de IAN-710 y GV-31 se leyeron en un densitómetro laser donde se obtuvieron los trazos de la figura 8. Aquí se observó un número considerable de bandas, aproximadamente 40, bien definidas aunque en algunas regiones no muy fácilmente discernibles una de otra.

Debido a la complejidad de las muestras totales y para obtener una mejor resolución, se procesó el suero total que se fraccionó después de pasarlo por permeación en gel (ver sección de Materiales y Métodos).

ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES .

En las fotografías 2, 3, 4 y 5 se muestran los patrones electroforéticos de las fracciones I, II y III de los clones estudiados. Estas fracciones se corrieron varias veces, no menos de seis, en diversos geles, obteniéndose a simple vista :

- a) resultados muy similares entre la misma fracción de diversos clones corridos dentro del mismo gel.
- b) resultados idénticos para la misma fracción de un clón dentro del mismo gel.
- c) resultados muy parecidos al comparar la misma fracción en diversos geles.

Para tener una interpretación menos sujeta a error visual, los resultados se compararon por medio de los registros densitométricos de las fracciones I, II y III de los tres clones. Los trazos de cada fracción se calcularon fielmente a un mismo papel con el traslape necesario para observar la coincidencia de las bandas.

Fracción I - en la figura 9 se puede observar cualitativamente que en general no hay diferencia en el número y posición de las bandas en esta fracción en los tres clones. Solo se observa diferencia en la altura de los picos, o sea de la concentración de cada banda o componente protomérico. La altura relativa se mantuvo sensiblemente constante dentro de los tres clones. Las bandas más concentradas fueron las mismas en los tres clones.

En el caso de GV-31, el pico señalado con una flecha vertical apareció claramente en los dos registros densitométricos, en GV-42 no apareció. En IAN 710 el pico señalado con una flecha horizontal queda intermedio entre el pico señalada en GV-31 y el pico anterior. Creemos con cierto grado de incertidumbre que dicha diferencia en la

fracción I pudiera servir para distinguir a los clones entre sí.

Fracción II - también estas fracciones presentaron un buen número de componentes protoméricos en su patrón electroforético. Los tres clones mostraron patrones idénticos entre sí bajo las mismas condiciones empleadas, sin embargo el patrón de GV-31 muestra una mejor resolución y mayor intensidad de las bandas (fig. 10).

Fracción III - podemos observar en la figura 11 que el patrón electroforético entre IAN-710 y GV-31 es idéntico, aunque el primero muestra mayor intensidad en sus componentes polipeptídicos.

* GV-31 710 GV-42



1. Patrón electroforético de las proteínas totales de diferentes clones de *Hevea brasiliensis* (* Estándares). Electroforesis vertical discontinua en gradiente de 5-15 % de poliacrilamida Bofer de electrodos Tris-glicina 0.025 M, pH 3.3 con SDS al 0.1 %, 80 mA a 15 ° C.

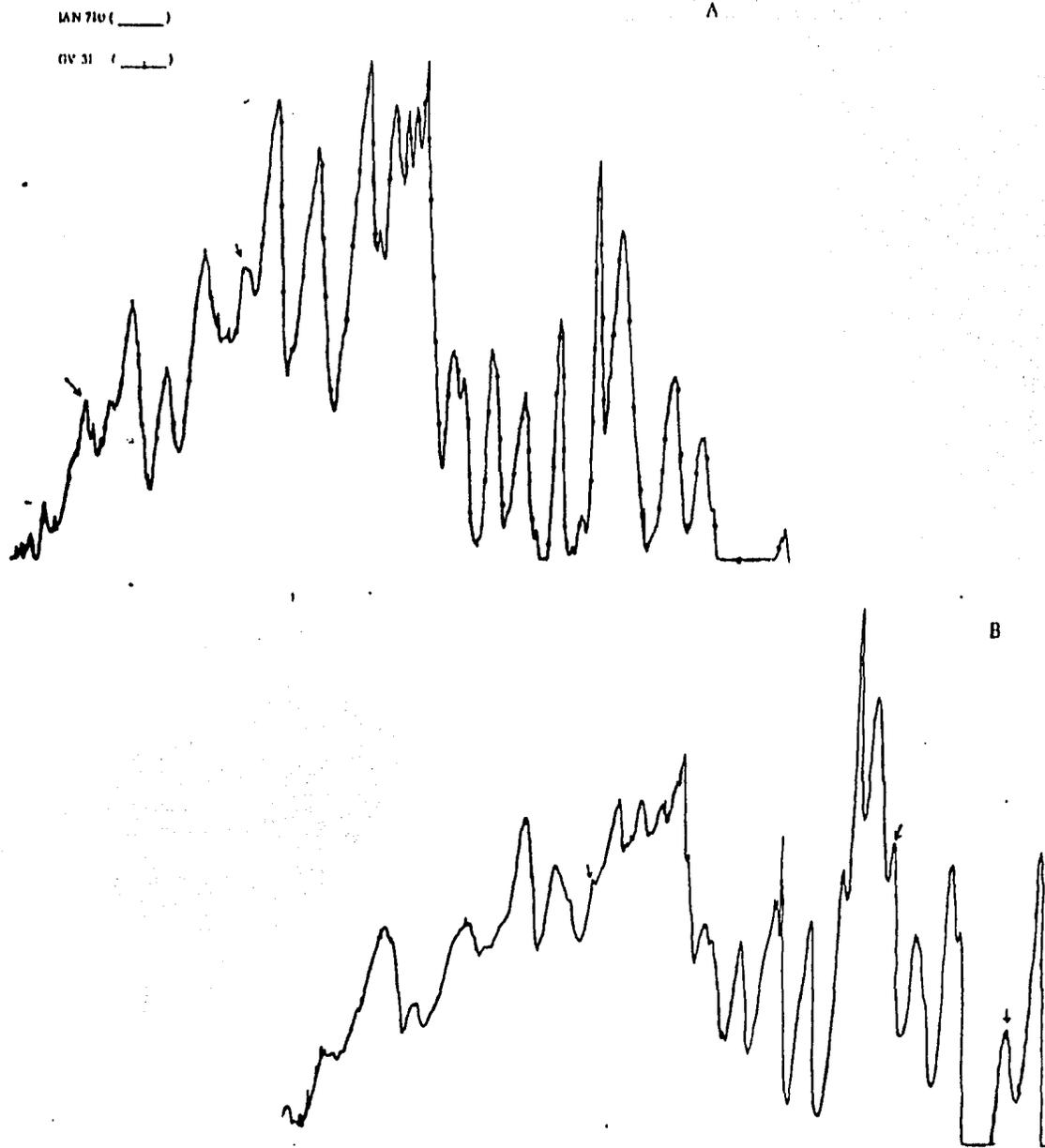
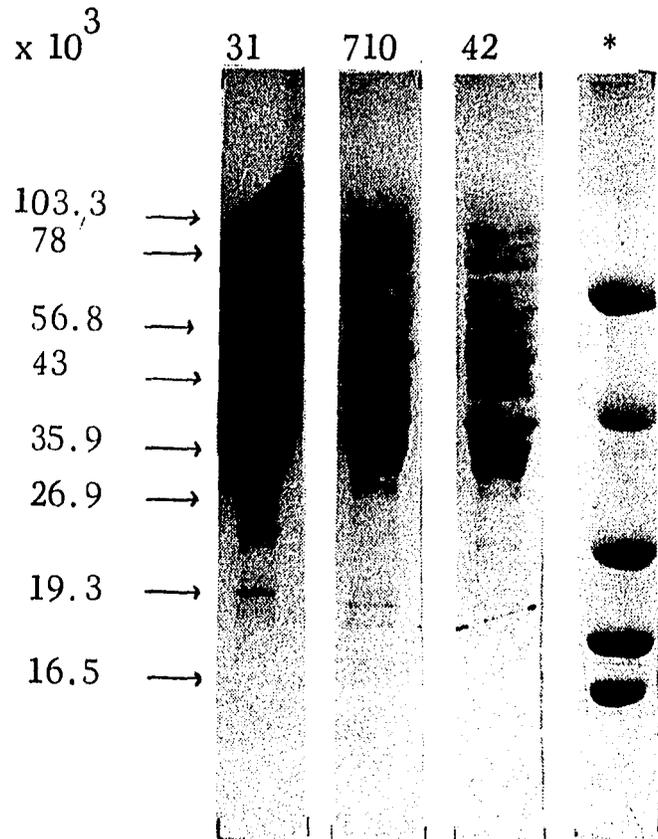
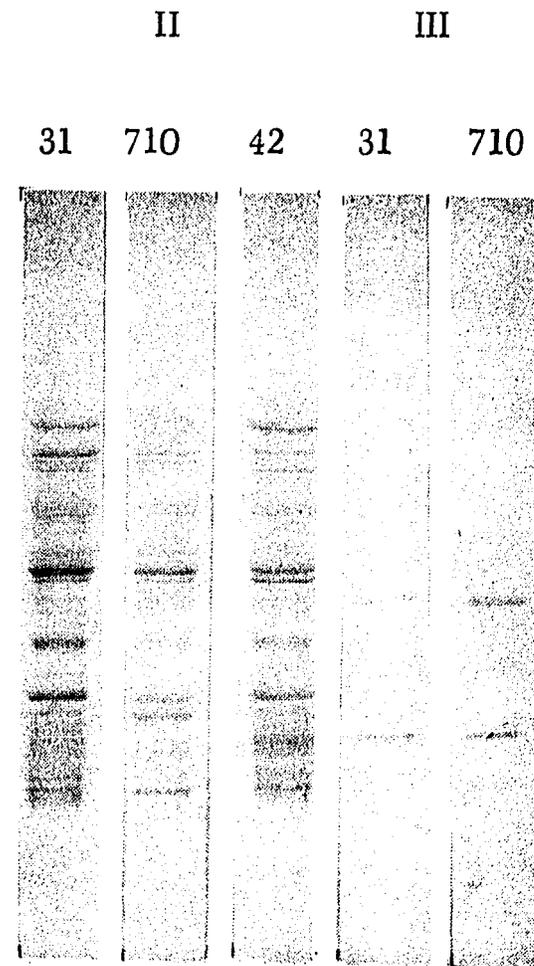


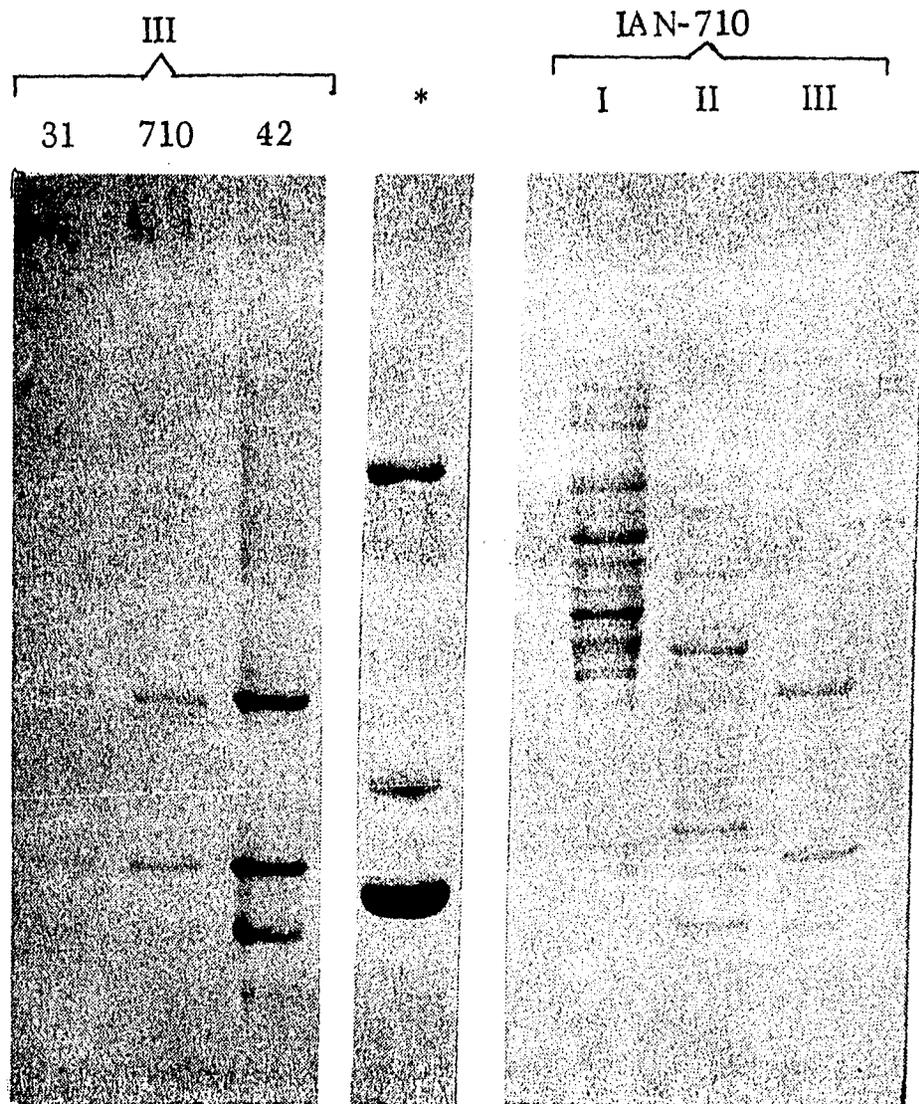
Figura No. 8 La complejidad de la muestra de proteína total se observa por la multiplicidad de protómeros obtenidos de IAN-710 (B) y GV-31 (A). Cada muestra contiene 200 μ g de proteína.



2. Patrón electroforético de la fracción I obtenida por filtración en Ultrogel AcA 44 de los clones GV-31, IAN-710 y GV-42. Los números de la izquierda corresponden a los pesos moleculares de algunos protómeros (* estándares). Las condiciones electroforéticas son las mismas de la fotografía 1.



3. Patrón electroforético de las fracciones II y III obtenidas por filtración, de los clones GV-31, IAN-710 y GV-42. Las condiciones electroforéticas son las mismas de la fotografía 1.



5. Patrón electrofotético de la fracción III de los tres clones y de las tres fracciones (I, II y III) de IAN-710 (* Estándares). Las condiciones electroforéticas son las mismas de la fotografía 1 .

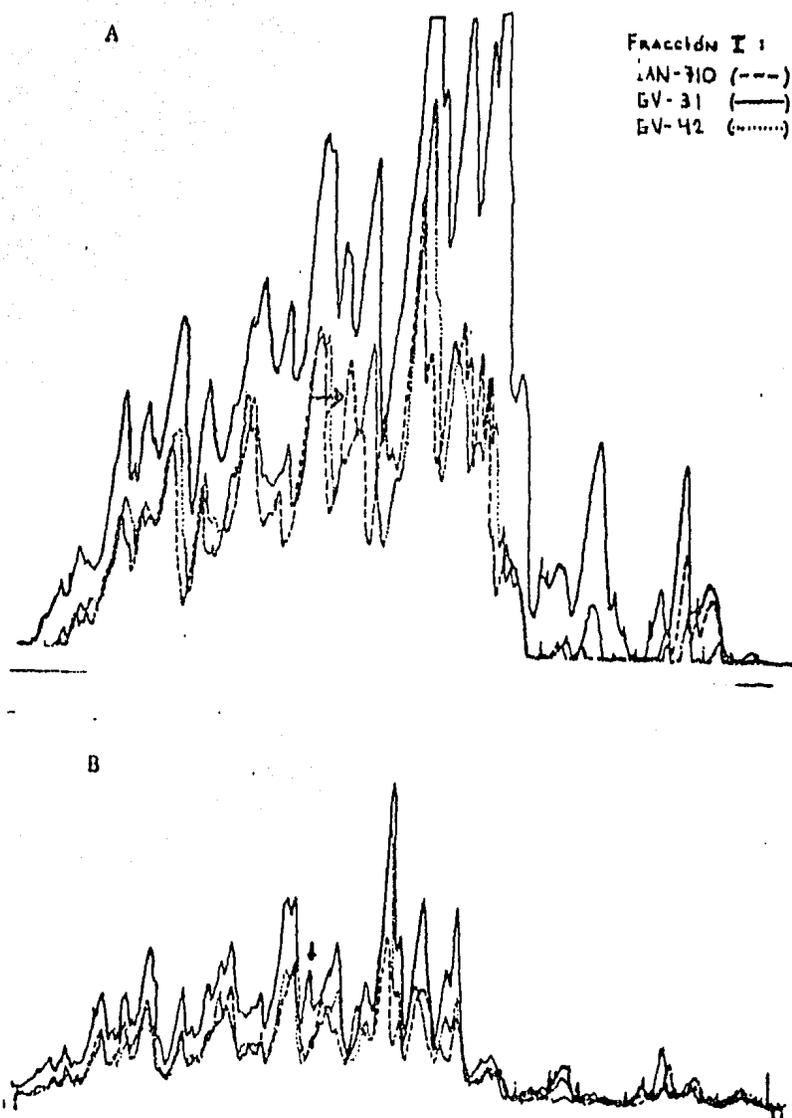


Figura No. 9. Comparación de los patrones electroforéticos (en dos geles diferentes A y B) de la fracción I de IAN-710, GV-31 y GV-42.

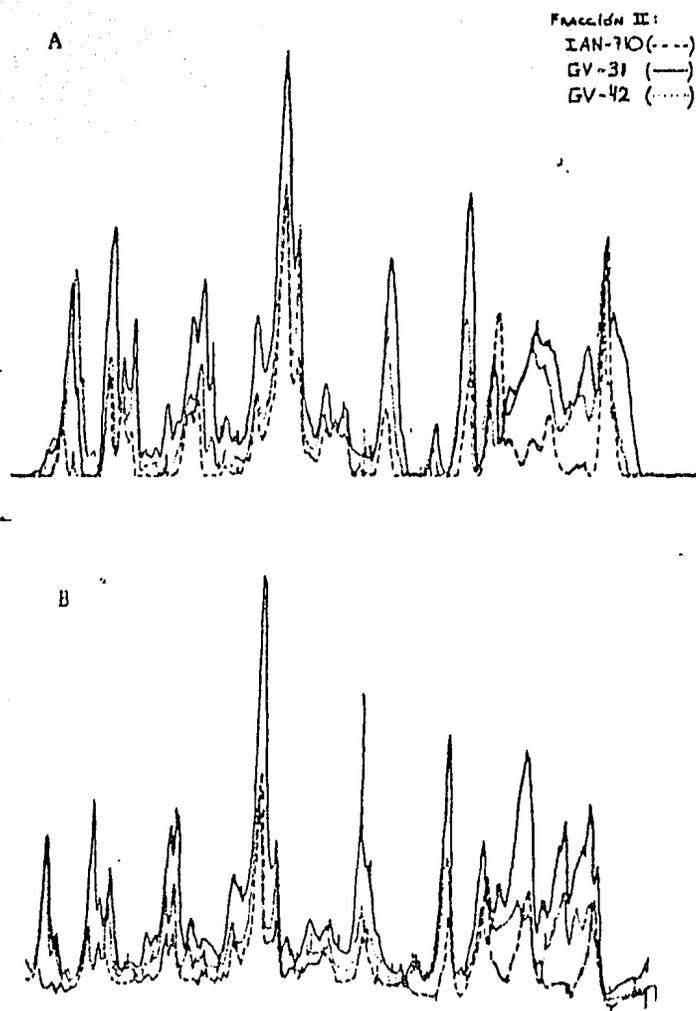


Figura No. 10 Comparación de los patrones electroforéticos (en dos geles diferentes A y B) de la fracción II de IAN-710 , GV-31 y GV-42.

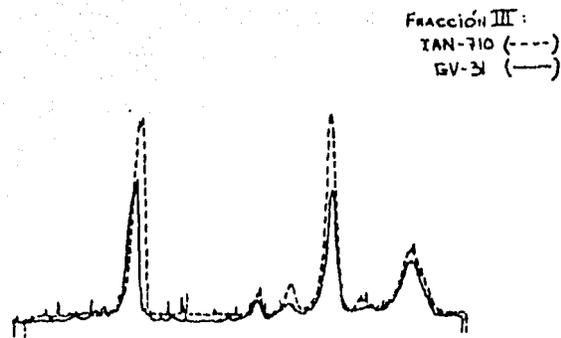


Figura No. 11 Comparación de los patrones electroforéticos de la fracción III de IAN-710 y GV-31.

El análisis de los datos se hizo con los pesos moleculares de algunas bandas que fueron escogidas por su intensidad y/o resolución, de las fracciones I, II y III en tres geles: 12.8, 13.1 y 14.0 cm de longitud.

Para calcular el peso molecular de cada banda se necesitó primero obtener una curva patrón con proteínas de PM conocido; para lo cual se calculó la distribución del gradiente de acrilamida en cada gel (tabla IV), se midió la distancia emigrada por cada proteína estándar y su correspondiente porcentaje de acrilamida alcanzado (fig. 12).

Posteriormente se trazó el \log_{10} del PM de los estándares contra el \log_{10} del % de T. La línea obtenida se ajustó por regresión (fig. 13).

En la gráfica de la figura 14 se demuestra la linealidad del gradiente para uno de los geles.

En la tabla V se puede observar los pesos moleculares estimados a partir de la curva de calibración para las bandas escogidas de la fracción I, II y III. El intervalo de PM de las diferentes fracciones va de 105,000 a 19,000 en la I; de 67,000 a 16,000 en la II y de 32,000 a 16,000 en la III aproximadamente.

El análisis de varianza se hizo con los resultados obtenidos en la tabla VI con el fin de comparar la variabilidad proteínica presente

entre los tres clones, ya observada en los registros densitométricos y en los geles mismos. Al mismo tiempo se estimó la variabilidad electroforética dentro de los clones.

La tabla VII presenta las F calculadas de las fracciones I y II tanto para los distintos clones como para los geles. Dado que la F de tablas para ambas fracciones y parámetros es de 6.94 para un nivel de significancia de 0.05, podemos observar que entre clones no hay una diferencia estadísticamente significativa en las bandas escogidas, excepto en la 4 de la fracción II, pero al comparar los clones en los distintos geles, es decir en cuanto a la variabilidad electroforética intraclonal, en cuatro bandas de la fracción I y en dos de la II la diferencia si es estadísticamente significativa.

En la tabla VIII se obtuvieron diferentes medidas de dispersión para las bandas 1, 2, 3 y 5 de cada clón en los tres geles.

Tabla IV

Distribución de la acrilamida (%) a través de geles en gradiente lineal de 5-15 %.

L.G.	12.8	13.1	14.0
Cm	% de Acrilamida		
0	5.62	5.08	5.06
1	6.40	5.84	5.77
2	7.19	6.60	6.48
3	7.97	7.37	7.19
4	8.75	8.13	7.90
5	9.53	8.89	8.61
6	10.31	9.66	9.32
7	11.09	10.42	10.03
8	11.87	11.18	10.74
9	12.66	11.95	11.46
10	13.44	12.71	12.16
11	14.22	13.47	12.87
12	15.00	14.24	13.58
13		15.00	14.29
14			15.00

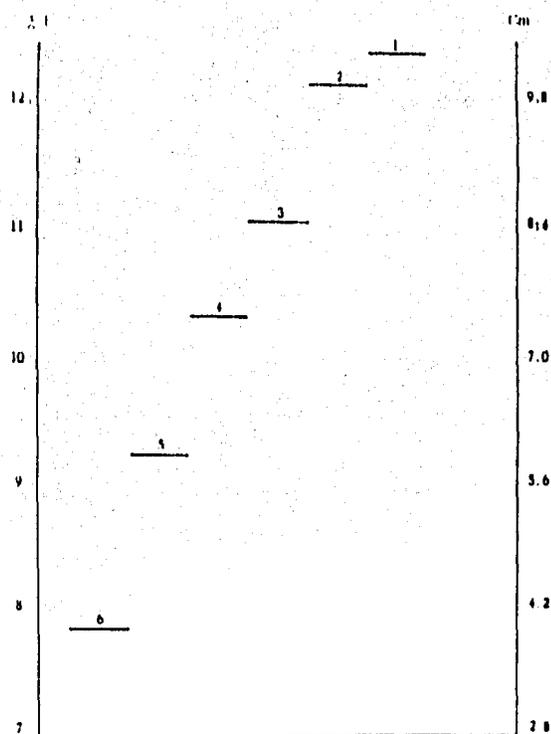


Figura No. 12 Relación entre la distancia emigrada y la concentración de poliacrilamida alcanzada por los estándares en un gel de 14 cm y gradiente de 5 - 15 %. (1) lisosima, --- (2) B-lactoglobulina, (3) tripsinógeno, (4) pepsina, - (5) ovoalbúmina y (6) albúmina de huevo.

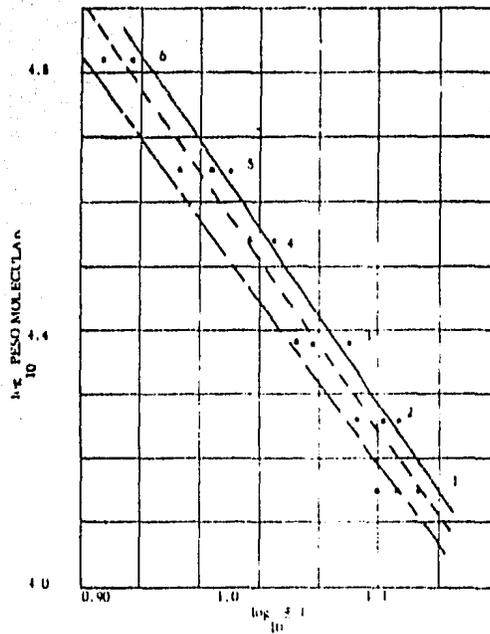


Figura No. 13 Curva de calibración del \log_{10} del PM de polipéptidos contra el \log_{10} del % de T para diferentes geles con gradiente lineal de 5 - 15 %. Los estándares utilizados fueron: 1 = lisozima (14,300), 2 = β -lactoglobulina (18,400), 3 = tripsinógeno (24,000), 4 = pepsina (34,700), 5 = ovalbúmina (45,000) y 6 = albúmina de bovino (66,000). Los coeficientes de determinación (r^2) fueron de 0.97 para los geles de 14 (\blacktriangle) y de 13.1 (\blacksquare) y de 0.98 para el de 12.8 (\bullet) cm de longitud.

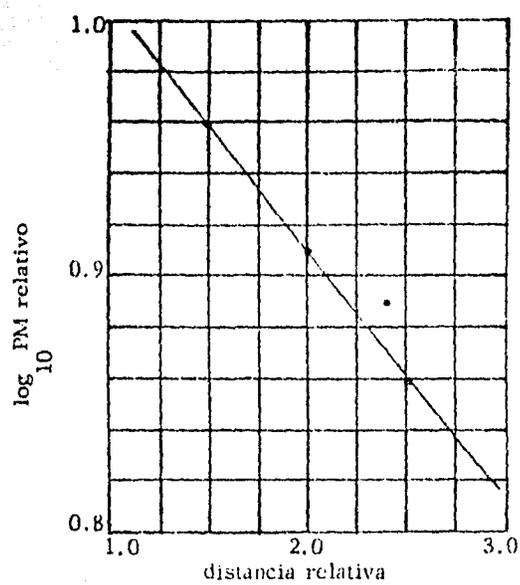


Figura No. 14 El trazo obtenido demuestra la linealidad del gradiente de 5 - 15 % de un gel de 13.1 cm. El trazo se obtuvo utilizando los estándares con respecto a la albúmina.

Tabla V

Pesos moleculares estimados para las bandas escogidas de la fracción I, II y III de GV-31, IAN-710 y GV-42 en geles de tamaño diferente.

clón	banda No	12.8 cm	13.1 cm	14.0 cm
GV-31 I	1	103,370	102,681	98,917
	2	78,082	76,180	75,282
	3	56,817	52,792	52,943
	4	43,082	39,405	40,293
	5	26,918	25,123	25,549
	6	19,345	18,866	19,543
IAN I	1	105,159	102,681	95,708
	2	79,305	74,977	73,457
	3	56,817	52,077	52,217
	4	43,082	39,405	40,077
	5	26,803	25,391	25,006
	6	19,345	18,861	19,414
GV-42 I	1	101,624	101,984	95,708
	2	79,305	76,180	73,457
	3	56,027	52,473	51,540
	4	43,082	39,405	38,806
	5	26,689	25,123	25,006
	6	19,345	18,866	19,414
GV-31 II	1	67,887	68,460	66,289
	2	55,206	55,039	52,943
	3	35,945	35,385	34,775
	4	22,233	22,289	21,565
	5	21,056	21,122	19,808
	6	16,585	16,411	15,722
IAN II	1	67,939	71,645	68,190
	2	55,507	56,603	53,637
	3	36,394	36,557	34,775
	4	22,372	22,289	21,289
	5	21,056	20,930	19,606
	6	16,419	16,573	15,722

continua

GV-42 II	1	66,891	69,506	65,877
	2	54,439	57,424	53,637
	3	35,945	35,654	34,775
	4	22,476	22,767	21,565
	5	21,286	21,346	19,808
	6	16,254	16,573	15,578
GV-31 III	1	32,973	32,900	
	2	19,587	20,168	
	3	16,637	16,842	
IAN III	1	32,973		
	2	19,894		
	3	16,898		
GV-42 III	1	32,973	32,900	
	2	20,206	20,168	
	3	16,898	16,842	

Tabla VI

Pesos moleculares de las bandas escogidas de las fracciones I y II relativos al peso molecular de una de las bandas de cada clón y fracción.

fracción	banda No	12.8 cm			13.1 cm			14.0 cm		
		31	IAN	42	31	IAN	42	31	IAN	42
I	1	2.40	2.44	2.36	2.61	2.61	2.59	2.45	2.39	2.47
	2	1.81	1.84	1.84	1.93	1.90	1.93	1.87	1.83	1.89
	3	1.32	1.32	1.30	1.34	1.32	1.33	1.31	1.30	1.33
	4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	5	0.62	0.62	0.62	0.64	0.64	0.64	0.63	0.62	0.64
	6	0.45	0.45	0.45	0.48	0.47	0.48	0.48	0.48	0.50
II	1	1.89	1.87	1.86	1.93	1.96	1.95	1.91	1.96	1.89
	2	1.54	1.53	1.51	1.56	1.55	1.61	1.52	1.54	1.54
	3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	4	0.62	0.61	0.63	0.63	0.61	0.64	0.62	0.61	0.62
	5	0.59	0.58	0.59	0.60	0.57	0.60	0.57	0.56	0.57
	6	0.46	0.45	0.45	0.46	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45

banda No. fuente variación	A	1		2		3		5		6	
		GL	S.C.	F.cal	S.C.	F.cal	S.C.	F.cal	S.C.	F.cal	S.C.
geles	2	0.07	21.14	0.01	14.42	5.5×10^{-4}	1.43	6.0×10^{-4}	9.0	2.1×10^{-3}	24.25
clones	2	2.6×10^{-4}	0.08	1.3×10^{-3}	1.58	1.5×10^{-4}	0.40	6.6×10^{-5}	1.0	1.5×10^{-4}	1.75
error	4	0.01		1.7×10^{-3}		7.7×10^{-4}		1.3×10^{-4}		1.7×10^{-4}	
total	8	0.08		0.02		1.4×10^{-3}		8.0×10^{-4}		2.4×10^{-3}	

banda No. fuente variación	B	1		2		4		5		6	
		GL	S.C.	F.cal	S.C.	F.cal	S.C.	F.cal	S.C.	F.cal	S.C.
geles	2	0.01	7.75	3.8×10^{-3}	3.33	1.5×10^{-4}	2.8	9.5×10^{-4}	10.75	2.8×10^{-4}	1.53
clones	2	1.4×10^{-3}	1.31	3.5×10^{-4}	0.29	6.2×10^{-4}	11.2	5.5×10^{-4}	6.25	1.5×10^{-4}	0.82
error	4	2.1×10^{-3}		2.4×10^{-3}		1.1×10^{-4}		1.7×10^{-4}		3.7×10^{-4}	
total	8	0.01		0.01		8.8×10^{-4}		1.6×10^{-3}		8.2×10^{-4}	

Tabla VII

Resultados del análisis de varianza para las bandas de la fracción I (A) y II (B) de LAN-710, GV-31 y GV-42 y en geles de diferente tamaño: 12, 8, 13, 1 y 14 cm ($\alpha = 0.05$; F tab. = 4.96).

Tabla VIII

banda No.	X			S			CV			EEIM			SESGO		
	31	IAN	42	31	IAN	42									
1	2.49	2.48	2.47	0.09	0.09	0.09	3.57	3.79	3.81	0.05	0.05	0.05	0.08	0.09	0.08
2	1.87	1.86	1.89	0.05	0.03	0.04	2.61	1.67	1.96	0.03	0.02	0.02	0.04	0.03	0.03
3	1.32	1.31	1.32	0.01	0.01	0.01	1.07	0.71	1.07	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
5	0.63	0.63	0.64	0.01	0.01	0.0	1.03	1.03	0.0	0.01	0.01	0.0	0.01	0.01	0.0

El látex de cada clón fué colectado de varios individuos con el fin de contar con una muestra representativa del genoma de la población total.

Con los patrones electroforéticos obtenidos de los tres clones de Hevea brasiliensis y analizados tanto por densitometría como por métodos estadísticos podemos observar que no hay una variación genética significativa entre estas poblaciones, en cuanto al contenido proteínico en el látex.

Con el análisis de varianza confirmamos que las bandas comparadas de cada fracción de los tres clones correspondían al mismo protómero y que las diferencias encontradas al compararlas entre geles distintos se debió precisamente a la longitud de cada gel, ya que ésta influye en la distribución del gradiente, la que a su vez determina la distancia emigrada por cada protómero.

En conclusión, no se encontró la relación esperada entre los clones de diferente nivel de producción de hule y un patrón electroforético característico de cada clón de las proteínas que se encuentran en los vasos laticíferos y que són las que aseguran la transformación de la sacarosa a hule.

La diferencia señalada en la fracción I (ver resultados) quizás pueda servir como punto de partida para otros trabajos enfoca-

dos al estudio de la caracterización de estos clones.

El método de electroforesis, tal y como se utilizó en este trabajo nos dió poca información para poder discriminar entre poblaciones de una misma especie; sin embargo se han reportado (22) algunos patrones electroforéticos característicos de diferentes clones para poner en evidencia distintas actividades enzimáticas en el látex de Hevea brasiliensis . Dichos estudios destacan al clón IAN-717, seleccionado en Brasil, como el que presenta el electroforegrama más rico, en cuanto al número e intensidad de las bandas, en comparación con clones de origen asiático.

También ha sido posible caracterizar a los clones a través de varias características fisiológicas y de establecer una relación entre éstas y la producción de hule para cada clón estudiado (23) (24) (25).

El conocimiento de estos parámetros y el estudio de iso-enzimas presentes en el látex por métodos electroforéticos podrán ayudar a definir criterios biológicos útiles para establecer una tipología de los clones con más alta producción para utilizarla en los programas de selección y mejoramiento genético de Hevea brasiliensis .

1. Schultes, K. E., 1977. The odyssey of the cultivated rubber tree. *Endeavour*, 1: 133 - 138.
2. Rodríguez, R., 1983. Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el cultivo del hule. Publicación especial No. 100. SARH, México.
3. Kobles, K., 1982. Producción de oleaginosas y textiles. Limusa, México, pp. 519 - 520.
4. Ochse, J. J., Soule, M. J. J., Dijkman, M. J. y Wehlburg, C., 1972. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Vol. II. Limusa, México.
5. Rodríguez, R., 1983. Un nuevo clón de hule para el trópico húmedo de México. Folleto técnico No. 1. SARH, México.
6. Jacob, J. L., Chrestin, H., d'Auzac, J. and Prévot, J. L., 1983. Regulations of the latex regeneration mechanisms in Hevea brasiliensis. Third FAOB Congress, Bangkok, Thailand.
7. Hébant, Ch., 1981. Organization fonctionnelle du tissu producteur de l'Hevea brasiliensis. *Rev. Gen. Caoutch. Plast.*, 53: 97 - 100.
8. Archer, B. L. and Sekhar, B. C., 1955. The proteins of Hevea brasiliensis. *Biochem. J.*, 61: 503 - 508.
9. Archer, B. L., 1976. Hevamine: a crystalline basic protein from Hevea brasiliensis. *Phytochemistry*, 15: 297 - 300.
10. Dintinger, J. Nicolas, D. et Nouy, B., 1981. Nouveaux criteres de selection precoce de l'Hevea: definition et premiers resultats. *Rev. Gen. Caoutch. Plast.*, 46: 85 - 91.
11. Man, A. B. and Blandford, D., 1980. The outlook for natural rubber in the 1980' s. Department of Agricultural Economics, Cornell University, Ithaca, N.Y.

12. Rubber Statistical Bulletin, 1981. Published by the International Rubber Study Group. Vol. 36. No. 2/3, London.
13. Plan de operación 1984. Fideicomiso del hule.
14. Instituto Mexicano del Comercio Exterior, marzo 1984.
15. Arreguín, B. y Taboada, J., 1968. Un aparato de diálisis continúa. Bol. Inst. Quim. UNAM, 20: 95 - 97.
16. Lowry, O. H., et al., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 256.
17. Instruction Manual LKB Ultrogel, 1976. LKB Produkter, Sweden.
18. Laboratory Manual LKB 2001 Vertical Electrophoresis Unit. LKB Produkter AB, Sweden
19. Lambin, P., 1978. Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrilamide gradient. Gel. Anal. Biochem., 85: 114 - 125.
20. Hames, B. D. and Rickwood, D., 1981. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Published by IRL Press Limited, London and Washington D.C.
21. Ludin, H. 1978. The selection of buffers for UV monitoring at 206 nm. Applications note 315. LKB Produkter AB, Sweden.
22. Jacob, J. L. Nouvel, A, et Prévot, J. C., 1978. Electrophorese et mise en evidence d'activites enzymatiques dans le latex d' Hevea brasiliensis. Rev. Gen. Caoutch. Plast., 22: 87 - 90.
23. Eschbach, J. M., Roussel, D., Van de Sype, H., Jacob, J. L. and d'Auzac, J., 1984. Relationships between yield and clonal physiological characteristics of latex from Hevea brasiliensis. Physiol. Veg. (under press).

24. Paardekooper, E. C., 1965. Clones of Hevea brasiliensis of commercial interest in Malaya. Rubber Research Institute of Malaya. Planting Manual No. 11, Kuala Lumpur.
25. Samosorn, S., Creencia, R. P. and Wasuwat, S., 1978. Study on yield, sucrosa level of latex and other important characteristics of Hevea brasiliensis Muell. Arg. I. As influenced by clone. Thai J. Agr. Sci., 11: 171 - 181.