

29
38



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

VALOR TAXONOMICO DE LA ELECTROFORESIS EN
PROTEINAS DE Opuntia robusta variedad larreyi
(WEBER) BRAVO Y Opuntia rzedowskii SCHEINVAR,
DEL PEDREGAL DE SAN ANGEL.

T E S I S

Para obtener el Título de
B I O L O G O

p r e s e n t a :

ELENA BARBARA ESTRADA GALVAN



México, D. F.

1986



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

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
a) Antecedentes y justificación.....	14
b) Objetivos	17
MATERIAL Y METODOS	
1) Selección del material	18
2) Reactivos	19
3) Obtención de extractos de proteína de parénquima de tallo	19
4) Electroforesis	22
RESULTADOS Y DISCUSION	33
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	50

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Alejandro Alagón por su paciente ayuda, sin la cual no hubiera sido posible la realización de éste trabajo, y a quien considero no solo un gran investigador, sino también una valiosa persona.

A la Dra. Léia Scheinvar, por la dirección, ayuda y confianza en la elaboración de ésta tesis, así como para muchos aspectos del estudio y de la vida, ya que posee un gran sentido investigador y humanitario.

A la M. en C. Magdalena Peña por sus valiosos consejos y comentarios, así como por el gran estímulo que recibí de ella.

A la M. en C. Alicia Mazari, de quien recibí valiosa ayuda en la realización de éste trabajo.

Al M. en C. Victor Chavez, por sus acertados comentarios en la estructuración de ésta tesis.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad y el material necesario.

A mis compañeros de laboratorio por lo mucho que aprendí con ellos.

Por último, hago patente mi reconocimiento a todas aquellas personas, como fotógrafos y dibujantes, que en alguna forma u otra intervinieron para hacer posible la realización de éste trabajo.

RESUMEN

Mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida se estudiaron las proteínas del parénquima del tallo de dos especies del Pedregal de San Angel: Opuntia robusta var. larreyi y Opuntia rzedowskii (Cactaceae), estudiando tres poblaciones de cada una de ellas.

Los resultados mostraron bandas comunes para los individuos de una misma población, así como para las tres poblaciones de una misma especie. Sin embargo, los patrones electroforéticos para una y otra especie fueron diferentes.

Los patrones electroforéticos obtenidos en geles de poliacrilamida permitieron distinguir entre O. robusta var. larreyi y Opuntia rzedowskii por medio de proteínas especie específicas como las de 40 000 y 23 000 daltones de peso molecular para la primera especie y las de 27 000, 25 000 y 22000 daltones para la segunda especie.

Por otro lado, se observaron dos proteínas de 55 000 y 33 000 daltones de peso molecular comunes a las dos especies.

Se recomienda el uso de la electroforesis para la taxonomía ya que que la bibliografía referida y los resultados obtenidos en el presente trabajo, apoyan el uso de ésta técnica para la taxonomía del género Opuntia.

Un mayor número de estudios permitira aplicarla a otros géneros de la familia Cactaceae, o bien a otras familias.

INTRODUCCION

La taxonomía vegetal es la ciencia que se ocupa de los principios y procedimientos de clasificación de las plantas (Radford et al., 1974). Para esto es necesario identificar el material en estudio. El término identificar implica que existe un gran número de plantas, cada una con características únicas y que pueden ser reunidas en grupos. Estas se refieren a la morfología, anatomía, fisiología, bioquímica y distribución geográfica. Por otro lado, el término clasificación implica que los grupos de plantas se ordenan bajo un plan jerárquico, tomando en cuenta la semejanza de sus características. La finalidad más importante del taxónomo no es la identificación, sino la clasificación, ya que es la que tratará de reflejar relaciones filogenéticas (Weier, 1980).

La historia de la taxonomía puede ser dividida en 2 períodos: prelinneano del año 300 A. C. al año 1753 D. C. y postlinneano, que comprende de 1753 a la época actual.

En el primer período se usaron básicamente rasgos morfológicos, como lo hizo Teofrasto aproximadamente en el año 300 A. C. al utilizar características como habitat, duración de la vida, forma de la corola y posición del ovario. Este período culmina con el naturalista sueco Linneo quien elaboró una clasificación de las plantas desarrollando su propio sistema llamado sexual. Se basaba casi exclusivamente en la morfología y número de estambres y pistilos. Linneo publicó su libro

"Species Plantarum" en 1753, en la cual incluye 6000 especies y 1000 géneros.

El período postlinneano se caracterizó por: a) la búsqueda de caracteres que reflejaran relaciones genéticas y b) la construcción de un patrón genético de clasificación. La elaboración de patrones filogenéticos exigía elegir las características que pudieran ser consideradas como primitivas y las que pudieran ser consideradas como avanzadas (Weier, 1980).

En lo que se refiere a la familia de las cactáceas, es un grupo de plantas de taxonomía muy compleja debido a: 1) la plasticidad adaptativa que presentan y que se refleja en una gran variación en las especies; 2) variaciones causadas tanto por alteraciones genéticas como por el medio ambiente; 3) se hibridizan y retrocruzan con facilidad (Benson, 1962); 4) gran número de poliploides; 5) muchas veces presentan dimorfismo acentuado entre el estado juvenil y el estado adulto. Todo esto determina la complejidad taxonómica de estas plantas, sujetas a diferentes clasificaciones, de acuerdo con los conceptos de los diversos cactólogos que consideran como más importantes distintas características al elaborar sus sistemas de clasificación. Así, la clasificación de las cactáceas fue primero linneana, después morfológica y actualmente tiende a ser biosistemática, esto es, se toman en cuenta tanto las características morfológicas y anatómicas, examinadas con microscopía de luz transmitida y electrónica de barrido, como las palinológicas, citogenéticas,

fisiológicas y quiniotaxonómicas (Scheinvar, 1982).

Otros dos factores que contribuyen a dificultar la clasificación de las cactáceas son: primero, la enorme sinonimia que se presenta en éstas plantas y que radica en el hecho de que muchos de los ejemplares colectados en América, eran llevadas a Europa donde fueron descritas como especies nuevas, sin conocer su variación en el campo (Scheinvar, 1982), y segundo, es que las descripciones originales de casi todas las especies antiguas están incompletas, faltando datos de gran importancia, como los de flores, frutos, semillas, etc.; además la mayoría sin tipos preservados en herbarios. Aumentando las dificultades, el hecho de que algunos autores copian a los anteriores, repitiéndose a veces datos equivocados.

Aunado a esto, la clasificación de las cactáceas se dificulta por el concepto de género y especie que tienen los diferentes cactólogos. Entre los diversos autores que han trabajado en esta familia, se presentan dos tendencias: la primera, que se podría llamar conservativista, propugna una reducción en los taxa en todos los niveles, sin tomar en cuenta, muchas veces, la estructura y color de las semillas y granos de polen y la segunda, a la que podríamos llamar radicalista, se caracteriza por una división extrema de los taxa.

La tendencia conservativista, en cuanto al concepto de género se refiere, se ejemplifica con el sistema propuesto por K. Schumann (1898) que sólo considera 18, y actualmente el grupo de cactólo-

gos de la Organización Internacional de Suculentas (IOS), que en 1984 se reunió en Kew y donde se propusieron 86 géneros para toda la familia (Hunt, 1986).

La tendencia radicalista se basa en los sistemas de Britton & Rose (1919- 1921) que incluyen 122 géneros y el de Backeberg (1958- 1962), que considera 235 géneros.

Esta diferencia de criterios, causa mucha confusión y dificulta la taxonomía de las cactáceas.

Por lo expuesto, se piensa actualmente que es necesario realizar un estudio biosistemático, en el cual los taxónomos tomen en cuenta un conjunto de características de diferentes disciplinas biológicas como la fisiología, citogenética, ecología, bioquímica, etc., y lograr así una taxonomía más natural. Además, los hallazgos en cada una de estas disciplinas, modifican y perfeccionan las clasificaciones anteriormente propuestas (Bravo, 1978; Santamour, 1982).

Una vez seleccionadas correctamente las características de cada taxon. técnicas modernas como: taxonomía numérica y cladística, permiten la elaboración de dendrogramas que indican las relaciones morfológicas y filogenéticas entre los mismos (Cutter, 1971; Sokal y Sneath, 1963; Brooks et al., 1984).

La aplicación de características químicas en la taxonomía, fue sugerida por algunos de los primeros taxónomos como Hoffmann en 1765, DeCandolle en 1828 y Hallier en 1903. Sin embargo, fue sólo hasta

décadas recientes que se desarrollaron métodos de análisis fisiológicos y de elucidación estructural de los compuestos orgánicos que se pudieron relacionar los taxa estudiados.

Cada componente químico encontrado en las plantas, ya sea metabolito primario, o bien, producto secundario del metabolismo puede ser utilizado en varios niveles taxonómicos en las comparaciones químicas de los taxa, a tal punto que en 1909, Greshoff sugirió que cada descripción de un nuevo género o especie, debía incluir una corta descripción química del taxón (Radford et al., 1974).

Una evidencia del apoyo que la química puede dar a la taxonomía, son los estudios que sobre betalainas se han llevado a cabo. Las betalainas son pigmentos que incluyen a las betacianinas, del rojo al violeta, y a las betaxantinas, de color amarillo (Nowicke, 1975).

Eichler (1876), incluye en el superorden Centrospermae 9 familias: Aizoaceae, Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Polygonaceae, Portulacaceae y Cactaceae, de las cuales sólo no poseen betalainas en el perianto las Polygonaceae y Caryophyllaceae. La familia Didiereaceae también contiene betalainas, pero no es incluida por Eichler dentro de dicho superorden. Más adelante Cronquist (1968) y Tachtajan (1973) basados en un examen de la presencia de betalainas en el perianto y de ultraestructura en los plastidios, transfieren a las Didiereaceae y a otras dos familias: Molluginaceae y Caryophyllaceae, dentro del orden Caryophyllales

(Nowicke, 1975; Radford et al., 1974).

La bioquímica, como instrumento taxonómico sólo se ha aplicado regularmente, dentro de la botánica desde hace aproximadamente 20 años (Weier, 1980).

La bioquímica estudia la naturaleza de las moléculas biológicamente activas, la relación funcional entre ellas, el control de su síntesis y degradación, y su mantenimiento organizado. Así, el bioquímico en sus investigaciones se enfrenta al problema de separar moléculas iguales a partir de un sin número de moléculas diferentes que coexisten al mismo tiempo, en células y tejidos vivos (Possani y Alagón, 1983).

En estos estudios se han utilizado casi todas las categorías de compuestos bioquímicos: azúcares, aminoácidos, grasas, fenoles, terpenos, alcaloides, etc., y se han aislado por medio de la cromatografía de papel, de la electroforesis, de la partición en solventes, o bien, más recientemente, por cromatografía de gases (Weier, 1980).

Por citar un trabajo, se puede referir el realizado por Mata y McLaughlin (1982) sobre alcaloides, en el que se revisó la bibliografía de 153 especies y variedades de la familia Cactaceae, señalando un total de 126 alcaloides.

Uno de los métodos más utilizados para comparar las similitudes taxonómicas de los organismos a nivel molecular es la electroforesis de gel que puede ser definida como el transporte de partículas cargadas, a través de un medio en el que están inmersas, por la ac

ción de un campo eléctrico (Alagón y Possani, 1983).

Es posible realizar varios grados de refinamiento analítico en estos estudios, variando desde una simple purificación de extracto crudo hasta la purificación de enzimas, o bien, obtener la "huella" de una proteína específica en diferentes taxa (Radford et al., 1974).

La electroforesis puede diferenciar entre enzimas, iso-enzimas y otras proteínas, con base en las diferencias de forma y carga, debidas a cambios en la secuencia de aminoácidos en las moléculas, y su determinación es una de las técnicas más precisas y elaboradas, que actualmente se utiliza en quimiotaxonomía (Weier, 1980; Santamour, 1982).

Cuando se analizan por medio de la electroforesis miembros de un mismo taxon, algunas bandas son comunes, revelando un alto grado de similitud genética, pero no hay que olvidar la posibilidad de que existan aún variaciones. Cuanto más se parecen los patrones electroforéticos de bandas proteicas, más cercana se supone, es la similitud genética (Weier, 1980).

En base a estudios realizados usando la electroforesis, se han generalizado 3 observaciones: 1) en poblaciones de plantas de la misma especie, la similitud genética es muy grande, 0.95 ± 0.02 ; 2) en especies de plantas del mismo género, la similitud genética existe pero está más reducida, 0.67 ± 0.07 ; 3) la variabilidad genética en diferentes poblaciones de plantas está muy relacionada con sus sistema de

reproducción. En poblaciones que se entrecruzan, ésta es más grande que en aquéllas en las que no hay entrecruzamiento (Gottlieb, 1977).

En algunos trabajos en los que se utiliza la electroforesis como herramienta taxonómica, se trata de reflejar relaciones filogenéticas, tal es el caso de los estudios de Henriksen y Jelnes (1980) y Rickeman y Desborough (1978). Algunos otros usan la evidencia electroforética para diferenciar entre especies, ya sea por sus proteínas, enzimas, isoenzimas (Tarroux, 1983; Wetter, 1982), o bien, por la presencia de compuestos que contiene cada extracto de tejido. Además, estos estudios pueden realizarse con todo tipo de organismos. Así, algunos trabajos como el de Tchan et al., (1983) se han realizado con bacterias; Laurenci et al., (1981) han trabajado con virus; Costas y Griffiths (1980) con amibas; Carlson y Vidaver (1982) con trigo; Cooke et al., (1983) con cebada y Murphy (1978) con fitoplancton. En todos estos trabajos los resultados han sido positivos, ya que incluso en uno de ellos, el de Costas y Griffiths (1980), por el resultado obtenido se pudo deducir que la clasificación taxonómica adoptada no era la correcta y ésta se basaba sólo en criterios morfológicos.

En animales, también se han realizado trabajos semejantes, como el de Jelnes (1979), que llevó a cabo un estudio con caracoles, o bien, el de Frair (1982) quien trabajó con tortugas; el de García (1983) que trabajó con ostras mexicanas y el de Biosca et al., (1985) con reptiles, y cuyos resultados fueron muy satisfactorios, pues en los patro-

nes electroforéticos obtenidos, el número de bandas se relacionó con el sexo y la edad, demostrándose también variabilidad entre las especies.

Por otro lado, no en todos los estudios la electroforesis ha sido exitosa, ya que para algunos organismos, como en el caso de ciertos peces (Fransen y Nibaruka, 1982), los resultados fueron poco satisfactorios.

Dentro de la electroforesis, técnica que cada día es más usada como apoyo a la taxonomía, la inmunoelectroforesis es donde se obtiene mejor resolución del análisis de proteínas, tal como se observa en los trabajos de Belova y Efimov (1981); Orr (1979); Frair (1982) y Tchan et al., (1983), entre otros. En ésta técnica, el análisis de resultados se hace a partir del precipitado producido. Es una técnica de refinamiento de la prueba de precipitación que genera datos cualitativos (Radford et al., 1974).

La electroforesis tiene algunas limitaciones. En primer lugar, no todos los tipos de enzimas son igualmente variables, y en segundo lugar, no todos los cambios en la secuencia de aminoácidos en una proteína, dan como resultado un cambio en la carga eléctrica o en la forma de la molécula (Weier, 1980). A pesar de estos inconvenientes, la electroforesis también presenta varias ventajas. La mayor de ellas es que asegura que pueden hacerse comparaciones bio-sistemáticas entre genes homólogos (de origen común), evitando problemas de convergencia y correlación. lo que frecuentemente prevalece en los caracte-

res morfológicos. Otra ventaja importante es que permite precisar y cuantificar las semejanzas y diferencias entre las proteínas que se presentan en bandas, cuyo número, posición e intensidad son características de cada taxon: especie, género, familia y rangos superiores (Weier, 1980; Gottlieb, 1977).

Actualmente, se considera que para ayudar a solucionar problemas taxonómicos en la familia Cactaceae es necesario realizar un mayor número de estudios en las diferentes ramas de la Biología, como en la bioquímica, en la cual la electroforesis puede aportar importantes datos de apoyo para su clasificación taxonómica.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Aunque en los últimos años se han realizado diversos trabajos usando la electroforesis como herramienta taxonómica: Carlson y Vidaver, 1982; Costas y Griffiths, 1980; Henriksen y Jelnes, 1980; Rickeman y Desborough, 1978; Wadell, 1979; Tchan et al., 1983; Franssen y Nibaruta, 1982; Laurencio et al., 1981; Orr, 1979 y Gottlieb, 1977; entre otros, ninguno de los estudios mencionados se ha llevado a cabo en cactáceas. El primer trabajo realizado en ésta familia, fue con el género Nyctocereus, por el Dr. Alejandro Alagón, Investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, a solicitud de la cactóloga Dra. Léia Scheinvar, Investigadora del Jardín Botánico de la misma institución, que deseaba apoyar un estudio biosistemático del género Nyctocereus con datos bioquímicos. Se trabajó con el parénquima de 3 especies del género mencionado: N. serpentinus, N. serpentinus var. splendens y N. castellanosii, obteniéndose de ellos los patrones electroforéticos que permitieron llegar a resultados interesantes y satisfactorios pues se concluyó que se trataba de especies distintas, lo que se apoyo con estudios de palinología, morfología comparada y citogenética (Scheinvar et al., 1985).

Después de éste trabajo, se realizaron 2 estudios en la misma familia pero con el género Opuntia. El primero con semillas de 7 especies procedentes del Estado de Querétaro: O. cochinerana, O. sarca,

O. guilanchi, O. hyptiacantha, O. leucotricha, O. pachona y O. joconostle. De éste trabajo los patrones electroforéticos obtenidos fueron muy semejantes para cada una de las especies estudiadas. Además, la gran cantidad de proteína presente en cada patrón impedía distinguir claramente las bandas. De éste estudio se concluyó que no es posible distinguir entre una y otra especie, cuando se trabaja con semillas, por lo tanto no puede utilizarse como apoyo a la taxonomía.

El segundo estudio se llevó a cabo con el parénquima del tallo de seis diferentes especies del mismo género: O. cretochacta, O. pachona, O. lindheimeri var. cuija, O. robusta, O. joconostle y O. leucotricha y con la Nopalea cochenillifera, también procedentes del estado de Querétaro.

En estos experimentos se presentaron problemas de tipo técnico debido a la consistencia viscosa del tejido. Sin embargo, tanto experimentos como problemas técnicos, fueron de gran utilidad para encaminar el presente trabajo.

En los geles obtenidos de las especies arriba mencionadas se observó un patrón electroforético diferente para cada una de ellas. Estos resultados fueron satisfactorios, ya que esto se pretendía al realizar éste tipo de trabajos, es decir, valorar si por medio de la electroforesis se podría distinguir entre diferentes especies, en éste caso, del género Opuntia.

Al obtenerse buenos resultados en estos experimentos

preliminares, se decidió trabajar con dos especies del Pedregal de San Angel, lo que permitiría realizar un diseño experimental con un mayor número de repeticiones.

- Se eligieron dos especies silvestres: Opuntia rzedowskii Scheinvar y Opuntia robusta var. larreyi (Weber) Bravo, por dos razones: la primera y más importante, el fácil acceso a dichas especies para su colecta y la segunda, su abundancia en dicha área.

Se pensó trabajar con éste género debido a la gran variación que presenta en el hábito y en la forma, número y color de las espinas, cuando se encuentran en distintas condiciones ecológicas. Además, presenta gran cantidad de híbridos y poliploides.

OBJETIVOS

Debido a que en la actualidad existen estudios que demuestran que la bioquímica es una importante herramienta de apoyo a la taxonomía, se planteó este trabajo con el objeto de evaluar si la electroforesis de proteínas puede ayudar a la taxonomía del género Opuntia.

Se sabe que este género es uno de los más variables dentro de la familia Cactaceae, por lo que se propuso determinar la validez de esta técnica para este género. Se eligieron para el estudio de la electroforesis en el parénquima del tallo, dos especies silvestres en el Pedregal de San Angel: Opuntia robusta var. larreyi (Weber) Bravo y Opuntia rzedowskii Schcinvar, las cuales son abundantes en esta zona.

Un segundo objetivo de este trabajo fue implementar y estandarizar la técnica electroforética en proteínas en geles de poli-acrilamida, para el género referido y poder en un futuro cercano, aplicarla a otras especies del mismo género así como a otros géneros de esta familia.

MATERIAL Y METODOS

1) Selección del material.

Las dos especies, Opuntia robusta var. larreyi y Opuntia rzedowskii, se colectaron cada una en 3 poblaciones del Jardín Botánico Exterior de la Universidad Nacional Autónoma de México, eligiendo y marcando 10 ejemplares de cada población, cuidando que todos los artículos fueran del mismo tamaño (aproximadamente de la misma edad). Además, los ejemplares fueron colectados en la misma estación del año, incluso en el mismo mes.

La localización de las poblaciones, tomando como referencia la casa de sombra del Jardín Botánico Exterior, fue para Opuntia robusta var. larreyi al N, NE y SE y, al N, E y SW para Opuntia rzedowskii.

Los artículos colectados se llevaron al laboratorio de Cactología del Jardín Botánico Exterior, donde fueron identificados por la Dra. Lécía Scheinvar.

Posteriormente, se llevaron al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde bajo la dirección del Dr. Alejandro Alagón, se elaboraron los extractos de proteína los cuales se conservaron en congelador a -18°C . En el mismo laboratorio se realizaron todos los geles del presente trabajo.

2) Reactivos.

- Acido acético (Sigma)
- Acido clorhídrico (Sigma)
- Acido perclórico (Sigma)
- Acrilamida (Biorad)
- Albúmina Sérica Bovina (ASB)
- Azul brillante de Coomassie G- 250 (Biorad)
- Azul brillante de Coomassie R- 250 (Biorad)
- Azul de bromofenol (Biorad)
- Buffer de fosfato salino; 0.015 M NaPO_4 + 0.15M NaCl, pH 7.2 (BPS)
- Dodecil Sulfato de Sodio(DSS) (Biorad)
- Glicerol (Sigma)
- Glicina (Sigma)
- Hidróxido de sodio (Sigma)
- Isopropanol (Sigma)
- Metil bis- acrilamida (Biorad)
- Persulfato de amonio (Biorad)
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Biorad)
- Tierra de diatomeas (Sigma)
- Tris (Hydroxymethyl) aminomethane o Tromethamine (Sigma)

3) Obtención de extractos de proteína de parénquima del tallo.

Al realizar estos extractos se presentaron varios pro-

blemas de tipo técnico debido a la consistencia viscosa del tejido, el cual contiene abundante mucílago. Esto se resolvió agregando tierra de diatomeas (esqueletos de sílice), al momento de moler el parénquima, disminuyendo así la consistencia viscosa, lo que facilitó la técnica. La tierra de diatomeas es inerte por lo que no causa alteración alguna en los extractos.

Otro problema fue la baja concentración de proteína presente en los extractos, lo cual se resolvió aumentando la concentración de la misma y utilizando otra relación entre los extractos de las muestras y el buffer de aplicación, es decir, en lugar de tomar 10^{ml} de cada extracto de proteína se tomaron 20 y el buffer de aplicación se concentró 5 veces.

Los pasos para obtener estos extractos fueron los siguientes:

- a) Quitar las espinas y la epidermis de los artículos y sacar el parénquima con una espátula. Eliminar las fibras liberoleñosas.
- b) Colocar el parénquima en un vaso pequeño de licuadora y agregar el buffer de extracción (BPS) junto con la tierra de diatomeas, previamente lavada por centrifugación.
- c) Licuar el parénquima hasta que quede una consistencia pastosa y partirlo en tubos de una microfuga.
- d) Balancear los tubos y centrifugar en la microfuga por espacio de un minuto.

- e) De cada tubo, succionar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, el cual corresponde al extracto de proteína. Eliminar el precipitado.
- f) Determinar proteína por el método de Bradford.

Método de Bradford. -Este método incluye el enlace del azul brillante de Coomassie G- 250 con las proteínas. Se basa en la observación de que el colorante mencionado existe en dos formas: roja y azul. Cuando se lleva a cabo el enlace del colorante con las proteínas, la forma roja se transforma en la azul. Esta unión entre colorante y proteínas causa un cambio en la absorción máxima del colorante, de 465 a 595 nm, registrándose la absorción a 595 nm. El método utiliza un patrón estandar de ASB (Albúmina Sérica Bovina) y consiste en lo siguiente:

A partir de una solución patrón de ASB se hacen diluciones con el buffer de extracción. De cada dilución se toman alícuotas de 100 μ l y se les agrega 1 ml de reactivo proteico (azul brillante de Coomassie G- 250, preparado con ácido perclórico). La reacción se lleva a cabo y se lee la absorbancia a 595 nm pasados 2 min, hasta 1 hora.

Con las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro se traza una gráfica patrón donde en el eje de las "x" se grafica la concentración de proteínas y en el eje de las "y" la absorbancia.

Por otro lado, se toman alícuotas de 100 μ l de los extractos a los que se les determinan las proteínas. Se les agrega 1 ml de reactivo proteico y se lee la absorbancia a 595 nm. Estas lecturas se grafi-

can en la curva patrón y se relacionan con la concentración de proteínas correspondiente.

La determinación de las proteínas se realiza con el fin de que, por un lado, se obtenga la proteína presente en cada extracto, y por otro lado, se pueda saber la cantidad de proteína que se coloca en cada canal electroforético, de modo que sea la misma en todos los carriles y así, poder hacer un estudio comparativo entre los diversos canales.

4) Electroforesis.

La electroforesis se realizó en pequeñas placas (10 X 10 X 0.1 cm) de gel de poliacrilamida (12.5%) y en presencia de DSS (dodecil sulfato de sodio), basándose en la técnica diseñada por Laemli (1970).

El hecho de que la electroforesis se realice en presencia de DSS, significa que al agregar éste detergente aniónico, su porción hidrocabonada se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, quedando la gran carga negativa del detergente orientada hacia la superficie de ellas. Al suceder ésta reacción, el DSS enmascara cualquier carga presente en las proteínas de modo que todo queda encerrado por cargas negativas. Así, las proteínas migran en el gel sólo en función de su peso molecular (Cooper, 1977), presentando menor movilidad electroforética las proteínas de mayor peso molecular.

Se utilizan dos geles, ambos con un espesor de 1 mm. El gel superior es el concentrador y el inferior es el gel separador, en el

cual, como su nombre lo indica, se separaran las proteínas. La concentración de 12.5 % de poliacrilamida separa proteínas dentro del rango de 10 a 200 kilodaltones.

Se utiliza también un sistema de buffers, el cual es de gran importancia por lo siguiente: 1) mantiene un pH constante el gel y 2) sirve como electrolito, conduciendo la corriente en el campo eléctrico. El pH más común es de 9, aunque para proteínas se usa en un rango de 4.5 a 9. El sistema consiste de 2 depósitos, uno inferior y otro superior, en el primero se conecta el ánodo cargado positivamente y en el segundo, el cátodo cargado negativamente (fig. 1).

a) Protocolo de soluciones para hacer los geles y buffers.

A. Se disuelven 50 g de acrilamida y 1.32 g de bis- acrilamida en agua y se afora a 165 ml.

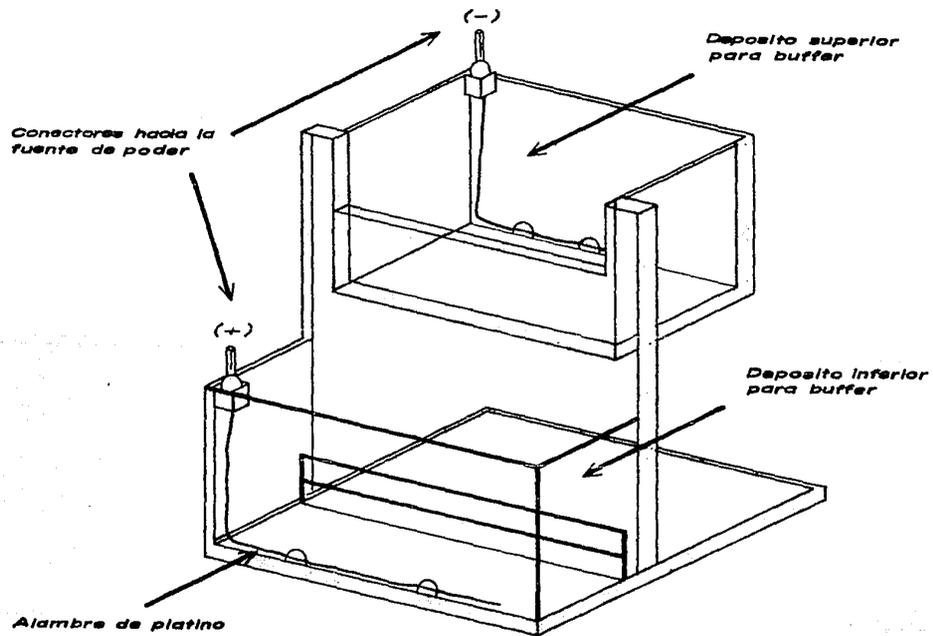
B. Buffer del gel separador (1.5M tris + 0.4% DSS).

Se disuelven 18.17 g de tris y 4 ml de DSS al 10% en 80 ml de agua destilada. Se ajusta a un pH de 8.8 con HCl (ácido clorhídrico) concentrado y se afora a 100 ml.

C. Buffer del gel concentrador (0.5.M tris + 0.4% DSS).

Se disuelven 6.06 g de tris y 4 ml de DSS al 10% en 80 ml de agua destilada. Se ajusta a un pH de 6.8 con HCl concentrado y se afora a 100ml.

Figura 1. Cámara electroforética para geles de poliacrilamida en placa.



D. Buffer de la cámara electroforética (0.025M tris + 0.19M glicina + 0.1% DSS).

Se disuelve 1.52 g de tris, 7.21 g de glicina y 5.0 ml de DSS al 10% en 450 ml de agua destilada. Se ajusta a un pH de 8.6 con NaOH (hidróxido de sodio) 10N y se afora a 500ml.

E. Buffer de la muestra.

Se mezcla 1.25 ml de buffer del gel concentrador, 100 μ l de DSS al 10%, 1 ml de glicerol y 0.4 ml de azul de bromofenol al 0.05% y se afora a 10 ml.

F. Persulfato de amonio al 10%.

Se disuelven 10 mg en agua destilada. Esta solución debe prepararse el mismo día que se va a usar.

b) Preparación y montaje de placas.

Las placas deben estar perfectamente limpias. Para ello, deben lavarse muy bien con jabón, enjuagar con agua de la llave y después con agua destilada. Se limpian con metanol y se dejan secar. Lo mismo debe hacerse con los separadores, la plantilla en forma de peine y la cámara electroforética.

Para montar las placas, se colocan los separadores entre ellas. Los dos cortos a los lados y el largo transversal a los anteriores, teniendo cuidado de que sus extremos toquen los separadores

más cortos. Ellos deben estar alejados de la orilla de la placa, aproximadamente 0.05 cm. Se colocan 3 "clips", cada uno presionando uno de los separadores. Por último, se sellan los 3 lados con agar al 1% (fig. 2).

c) Preparación del gel separador.

Soluciones:

1) Buffer del gel separador (solución B)	1.5 ml
2) Acrilamida (solución A)	2.5 ml
3) Agua destilada	2.0 ml
4) Tetrametiletilendiamina (TEMED)	5.0 μ l
5) Persulfato de amonio (solución F)	20.0 μ l

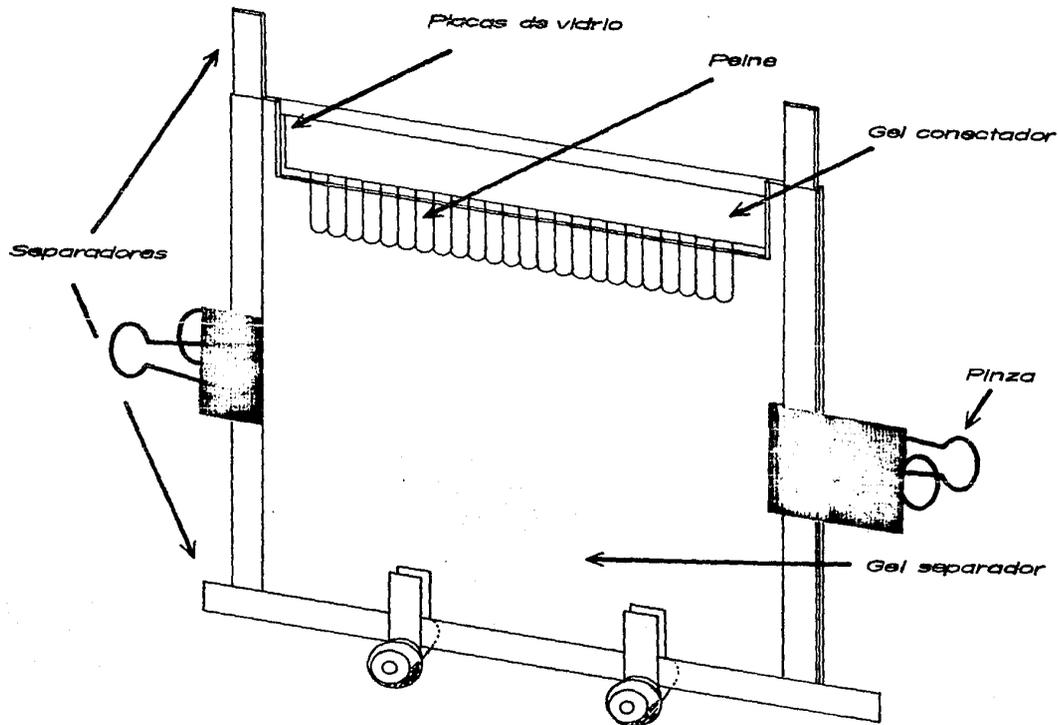
El gel debe prepararse agregando las soluciones en el orden en que están enlistadas y especialmente el persulfato de amonio al final, ya que es el catalizador de la reacción. Inmediatamente después, se coloca esta mezcla en la placa con una pipeta Pasteur, cuidando que no se formen burbujas. Se agrega después, aproximadamente 150 μ l de agua, con el fin de tener el gel con la superficie plana. El agua se elimina por capilaridad con papel secante, antes de agregar el gel concentrador.

El gel separador tarda en polimerizar de 20 a 30 min.

d) Preparación del gel concentrador.

Soluciones:

Figura 2. Placas montadas para la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida.



1) Buffer del gel concentrador (solución C)	0.63 ml
2) Acrilamida (solución A)	0.33 ml
3) Agua destilada	1.54 ml
4) Tetrametiletilendiamina (TEMED)	2.5 μ l
5) Persulfato de amonio (solución F)	12.5 μ l

Como en el gel separador, éste gel debe prepararse agregando las sustancias en el orden descrito. Aplicar una pequeña porción, con el objeto de que se elimine el exceso de agua, descartarlo y entonces agregar el resto del gel. Se coloca inmediatamente el peine (fig.1).

El gel concentrador tarda en polimerizar de 20 a 30 min, mientras tanto, pueden prepararse las muestras.

e) Preparación de las muestras de proteína.

Los extractos se diluyen con el buffer de la muestra (solución E) para obtener una concentración de proteínas de $500 \frac{\mu}{g}$ /ml. Se usan de 10 a 30μ para cada abertura del gel. Antes de aplicar las muestras de proteína se debe dejar de 10 a 15 min en agua caliente; mientras, se puede montar la cámara electroforética.

f) Montaje de la cámara electroforética y aplicación de las muestras.

De las placas, se retira el separador transversal, lo mismo que el agar que lo sellaba. Se colocan las placas en el depósito inferior de la cámara electroforética y los clips de los lados, ahora presionaran y detendran las placas pegadas a la cámara (fig. 2).

Agregar el buffer de la cámara electroforética primero en el depósito inferior, teniendo mucha precaución, pues no deben quedar burbujas abajo del gel. Después, se agrega el buffer al depósito superior, lo suficiente para que cubra aproximadamente 1 cm arriba de cada una de las aberturas del gel.

Se retira el peine, cuidando que no se rompa el gel superior que adquirió la forma de peine. con dientes, es decir, las aberturas del gel en las cuales se aplican las muestras.

La aplicación de las muestras se lleva a cabo con una jeringa graduada en microlitros, teniendo cuidado de no contaminarlas, por lo que la jeringa debe enjuagarse en el buffer después de cada aplicación.

En cada abertura del gel se colocan de 10 a 30 μ l de la muestra, que migraran al fondo por el glicerol que contienen y que las hace más densas.

En una de las aberturas del gel se colocan marcadores de peso molecular, con referencia a los cuales se podrá calcular el peso molecular de las proteínas presentes.

g) Corrimiento de los geles.

Después de colocar el gel en la cámara electroforética se agrega el buffer (solución D) en ambos depósitos y se colocan las muestras, haciéndose pasar corriente eléctrica.

Se aplica primero un voltaje de 50 en la primera hora, o bien, cuando el frente electroforético llegue al gel separador, entonces se incrementa a 100 volts. La corriente se suspende cuando el frente electroforético (indicado por el azul de bromofenol) se concentra a un par de milímetros del final del gel.

h) Tinción.

El gel sin placas ni separadores, se sumerge durante 2 horas en una solución que contiene ácido acético al 10%, isopropanol al 25% y azul brillante de Coomassie R- 250 al 1%, con el fin de teñir las proteínas.

El exceso del colorante se eliminó con una solución de isopropanol al 10% y ácido acético al 10%, durante 24 horas.

Para tener un registro de los gels realizados, se tomaron fotografías (figs. 4 a 10).

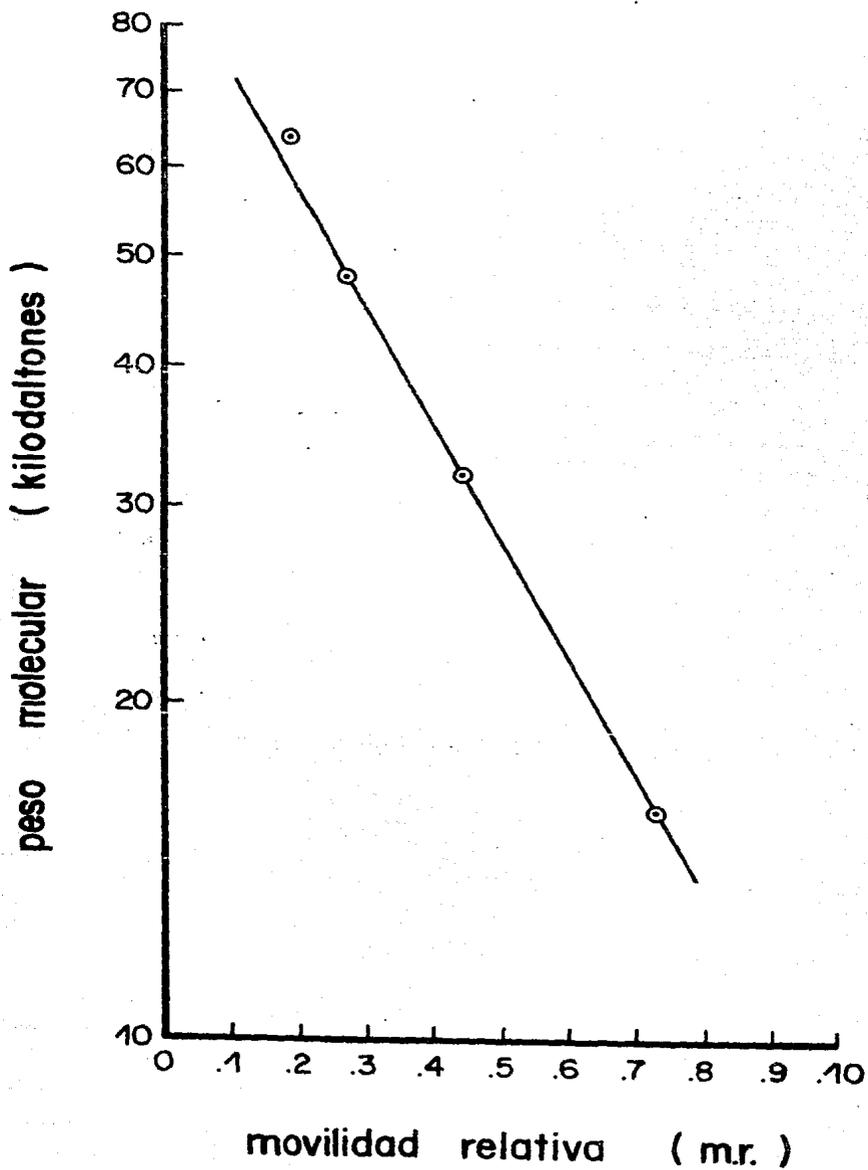
i) Análisis de resultados.

Determinación del peso molecular a partir de los resultados obtenidos en los gels de poliacrilamida en presencia de DSS.

La migración de una proteína en el sistema electroforético empleado es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Esto permite obtener el peso molecular de una proteína en la que no se conozca dicho parámetro, siempre que haya marcadores adecuados. Para éste fin se procede de la siguiente manera:

- 1) Se mide la distancia recorrida en el gel separador de cada uno de los marcadores.
- 2) Se obtiene la movilidad relativa (m. r.) para cada uno de ellos, dividiendo el valor obtenido en (1) entre la longitud total del gel.
- 3) Se construye una curva patrón utilizando papel semilogarítmico en donde en el eje de las "x" se grafica la m. r. y en el eje de las "y" (escala logarítmica) se grafica el peso molecular de cada uno de los marcadores (fig. 3).
- 4) Para encontrar el peso molecular de una proteína basta determinar su m. r., localizarla en la gráfica y buscar el peso molecular que le corresponde.

Figura 3. Curva de calibración para determinación de pesos moleculares empleando geles de poliacrilamida /DSS. Los datos fueron tomados de los resultados mostrados en la figura 6.



RESULTADOS Y DISCUSION

Por medio de la electroforesis se obtuvieron los patrones electroforéticos de dos especies del Pedregal de San Angel: O. robusta var. larreyi y O. rzedowskii.

Los resultados fueron analizados a tres niveles:

- 1) Variaciones entre individuos de una misma población.
- 2) Variaciones entre poblaciones de una misma especie.
- 3) Variaciones entre las dos especies en estudio.

En primer lugar, se realizó la electroforesis de las proteínas del parénquima de individuos de las 3 poblaciones seleccionadas de O. robusta var. larreyi. Los resultados se muestran en las figuras 4, 5 y 6, respectivamente. Es importante recalcar que, como se puede observar en la figura 4, la cantidad de proteína aplicada en cada carril, que corresponden a distintos individuos, fue la misma (13.6 μ g), de acuerdo al método de Bradford. Esto es necesario cuando se realizan comparaciones de patrones electroforéticos, ya sea entre individuos, poblaciones o especies. Sin embargo, resultó evidente que la variación en la intensidad de las bandas proteicas, entre un individuo y otro fue diferente, indicación clara de que la cantidad de proteína varía entre ellas; por ejemplo, los carriles 2, 3, 4, 6 y 9 presentan bandas más intensas que los carriles 5, 7 y 8. Las razones de esta disparidad no son conocidas, si bien existen algunas probables explicaciones. La primera es que el

método empleado para cuantificar proteínas, que es ampliamente reproducible con proteínas modelo, detectó otros compuestos aparte de proteínas y que éstas sustancias de naturaleza desconocida variaron en su concentración en los extractos, o bien, que algunos compuestos interfirieron con el azul brillante de Coomassie G- 250 y las proteínas (Bradford, 1976). Cabe mencionar que la concentración de proteína en los extractos varió desde 0.68 hasta 1.50 mg/ml.

Se conocen algunas sustancias que pueden interferir con el método de Bradford, como la presencia de algunos detergentes (triton X- 100), altas concentraciones de sales, etc., que no fueron usadas en éste trabajo, lo que no descarta la posibilidad de que compuestos propios del parénquima de los artículos hayan tenido ésta acción deleterea.

Una probable segunda explicación pudo residir en algo menos rebuscado. Los extractos son altamente viscosos por la presencia de mucílago, lo que provocó una manipulación difícil, sobre todo en el momento de medir volúmenes con micropipeta. Así, la disparidad que se observó, pudo deberse a errores mecánicos en su manejo. Es impor tante mencionar que la viscosidad aparente variaba de extracto a extracto por lo que el posible error, también sea variable. Consientes de éste problema, las manipulaciones se realizaron con el mayor cuidado posible a fin de disminuir el error humano.

La tercera alternativa pudo deberse a que existe cierto material que no penetró en el gel separador ni en el gel concentrador.

Esta situación es más evidente en la figura 5. Cuando esto sucede existen 3 posibilidades: 1) que las proteínas tengan un peso molecular extremadamente elevado; 2) que la muestra contenga proteínas precipitadas y 3) que las proteínas se asocien entre sí o con compuestos altamente cargados. Como los extractos fueron centrifugados, la presencia de proteína precipitada quizá pueda descartarse, ya que son eliminadas por éste método.

En lo que se refiere a las proteínas de muy alto peso molecular (mayores a 500 000 daltones), estas son raras en la naturaleza.

Por otro lado, si los mucopolisacáridos que ocasionan la alta viscosidad están sulfatados, pueden servir como atrapadores de proteínas a través de sus cargas negativas; éste tipo de interacciones son difíciles de romper, ya que se requieren concentraciones altas de sales, así como temperaturas elevadas (Stryer, 1975).

Un estudio mucho más riguroso que el presente exigiría solucionar el problema que se está presentando, es decir, deberá igualar la cantidad de proteína en cada carril, para poder comparar los patrones electroforéticos adecuadamente.

Volviendo a la figura 4, se puede mencionar lo siguiente: para todos los individuos se observó un patrón cualitativo muy semejante, aunque existen algunas bandas que apenas se distinguen por su baja intensidad. Debe resaltarse la presencia de 4 bandas, que son las que más destacan y son las de 54 000, 40 000, 35 000 y 23 000 daltones de

peso molecular.

La figura 5 muestra los resultados con otra población de la misma especie. La cantidad de proteína aplicada fue de aproximadamente la mitad que en el gel anterior ($7.7 \mu\text{g}$). Esto se debe a que, por un lado, la concentración de proteína en los extractos fue menor que para la población arriba referida (rango: 0.31 a 1.39 mg/ml), y por otro lado, para lograr la misma concentración de proteínas en todos los carriles, hay que tomar la de menor concentración como punto de referencia.

Los resultados fueron muy similares a los descritos para la población anterior. De nuevo las bandas más notorias fueron las de 54 000, 40 000, 35 000 y 23 000 daltones. El problema de la disparidad en la cantidad de proteína entre carril y carril, siguió siendo el mismo, lo que se puede constatar al observar bandas más intensas que otras.

Con la tercera población de O. robusta var. larreyi (fig. 6) se pudo aplicar mayor cantidad de proteína ($17.3 \mu\text{g}$), ya que la concentración de la misma en los extractos fue más grande (rango: 0.98 a 1.44 mg/ml). Esta situación permitió que las bandas se observaran con mayor claridad que en los casos anteriores. De hecho, el número total de bandas observadas fue más grande, pero lo más interesante fue que las 4 bandas descritas de 54 000, 40 000, 35 000 y 23 000 daltones de peso molecular, siguieron siendo las dominantes. El problema de la cantidad desigual de proteína real persistió, ya que, por ejemplo, los carriles

4 y 5 que como se observa tienen la mayor cantidad de proteína, son las muestras que presentaron menor concentración de la misma al determinarla por el método de Bradford. Es interesante mencionar que en este caso se observaron por lo menos en 5 individuos, bandas con peso molecular menor a 16 000 daltones, que antes no se habían observado, por lo menos claramente, en las dos primeras poblaciones. Esto resultó seguramente de la aplicación de mayor cantidad de proteína.

Al hablar de la presencia de una u otra banda que sobresalió por su intensidad, no se pretende decir que en unos carriles estuvo presente y en otros no; ya que en todos los patrones electroforéticos se presentan las mismas bandas, misma migración, variando sólo la intensidad de las mismas, es decir, patrones cuantitativamente distintos pero cualitativamente semejantes.

Al analizar las 3 poblaciones de O. rzedowskii, los problemas mencionados para O. robusta var. larreyi también se presentaron, pero desafortunadamente, con mayor magnitud. En términos globales, a mayor concentración de proteína obtenida por el método de Bradford, la concentración real de ésta en el gel, fue menor; por ejemplo, en la primera población (fig. 7) en que se utilizaron 12.8 μg por carril, los resultados fueron satisfactorios, sin embargo, con la segunda población (fig. 8), en la que supuestamente se usó mayor cantidad de proteína (17.8 μg), los resultados fueron muy pobres. Con la tercera población (fig. 9), en la que se usaron 14.7 μg de proteína para cada indivi-

duo, los resultados fueron intermedios. A pesar de lo anterior, fue posible sacar algunas generalizaciones: 1) los patrones electroforéticos entre los individuos de una población, así como entre las poblaciones fueron cualitativamente semejantes; 2) existen 5 bandas que son las más notorias para las 3 poblaciones de O. rzedowskii y cuyos pesos moleculares, de mayor a menor, fueron de 55 000, 33 000, 27 000, 25 000 y 22 000 daltones; 3) las bandas entre 22 000 y 27 000 daltones fueron altamente características para ésta especie. Es importante mencionar que para unos individuos de algunas poblaciones, por ejemplo, los carriles 2 y 4 de la figura 8, presentaron bandas tan débiles que fue difícil, sino imposible, extender las generalizaciones arriba mencionadas.

Cabe aclarar que de cada población se colectaron 10 individuos, sin embargo, como puede observarse en las figuras 4 a 9, que corresponden a las 6 poblaciones de las 2 especies, de ninguna se mostraron los 10 individuos. Esto se debió a que extractos de algunos artículos presentaron muy baja concentración de proteína, por lo que, al correrlos en el gel, no se observó banda alguna y fue por ésta razón que dichos extractos se descartaron. Además, puede observarse que en las 3 poblaciones de O. rzedowskii (figs. 7, 8 y 9), el número de individuos presentados es menor que los mostrados de O. robusta var. larreyi (figs. 4, 5 y 6). Esto se debió a que en la primera especie, éste problema se acentuó.

A fin de lograr una comparación más directa entre las 2

especies estudiadas, se seleccionó un extracto de cada una de las poblaciones (fig. 10). Para ésto se eligió el extracto que dió el mejor patrón electroforético en cada caso. Los resultados fueron semejantes a los obtenidos en las figuras anteriores y se pudo comprobar que las bandas de 55 000 y 33 000 daltones fueron comunes para ambas especies y que las bandas de 40 000 y 23 000 daltones fueron exclusivas de O. robusta var. larreyi, así como las de 27 000, 25 000 y 22 000 daltones lo son para O. rzedowskii. Además, pudo observarse con claridad que existe otra banda de 37 000 daltones común para las dos especies.

Cabe recalcar que estos experimentos son de los primeros que se obtienen usando la electroforesis como herramienta de apoyo a la taxonomía de las cactáceas. Es por esto que es necesario realizar un mayor número de ensayos para obtener resultados que apoyen la técnica.

Un estudio de aminoácidos e isoenzimas resultará mucho más preciso, aunque la técnica es más cara y elaborada. Sin embargo, sería interesante llevar a cabo un ensayo de su valor taxonómico comparando estos resultados con el análisis de proteínas.

Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida/DSS de extractos de parénquima de 8 individuos de una misma población de Opuntia robusta var. larreyi. La concentración de acrilamida fue de 12.5% ; las proteínas migraron hacia abajo en dirección del ánodo y fueron teñidas con azul brillante de Coomassie R- 250. En todos los casos se aplicaron 13.6^µg de acuerdo al método de Bradford. El carril 1 contiene marcadores de peso molecular conocido. Las condiciones sobre todo el experimento se mencionan en Material y Métodos.

P. M.

X 10³

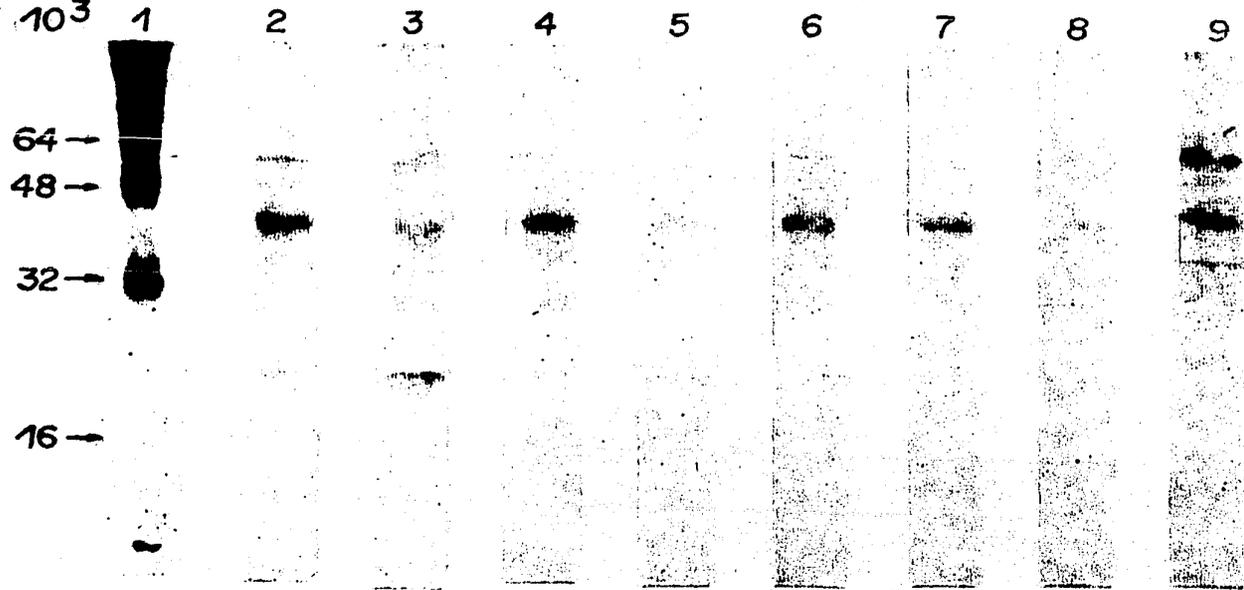


Figura 5. Patrones electroforéticos de extractos de parénquima de 7 individuos de una misma población de O. robusta var. larreyi. La concentración de proteína para cada carril fue de 7.7^µg. Las demás condiciones sobre la electroforesis son iguales a las mencionadas en la figura 4.

P.M.

$\times 10^3$

1

2

3

4

5

6

7

8

64 →

48 →

32 →

16 →

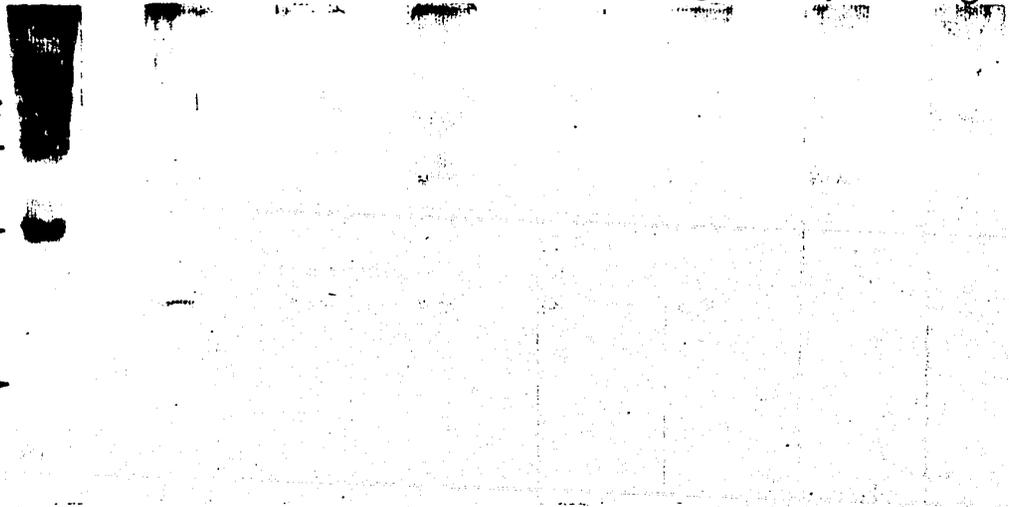


Figura 6. Electroforesis de las proteínas de parénquima de tallo de 8 individuos de una misma población de O. robusta var. larreyi. La concentración proteica por carril fue de $17.3 \mu\text{g}$. La electroforesis se realizó en las mismas condiciones que en la figura 4.

P.M.

$\times 10^3$

1

2

3

4

5

6

7

8

9

64 →

48 →

32 →

16 →

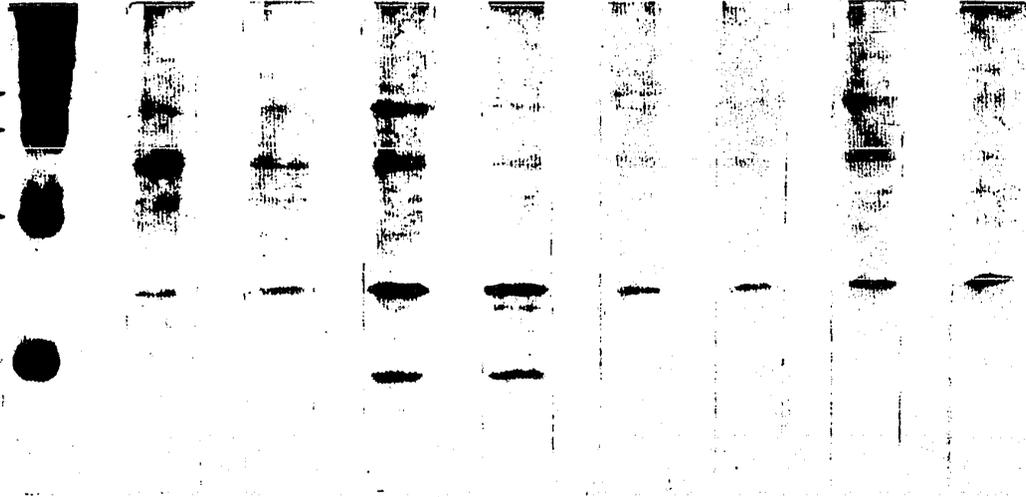


Figura 7. Patrones electroforéticos de parénquima de tallo de la primera población de Opuntia rzedowskii. Se aplicaron 12.8 μ g de proteína para cada uno de los 7 individuos. Los geles de ésta especie se corrieron en las mismas condiciones que la anterior.

P.M.

$\times 10^3$

1

2

3

4

5

6

7

8

64 →

48 →

32 →

16 →



Figura 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida/DSS de extractos de extractos de parénquima de 5 individuos de la segunda población de O. rzedowskii. Se corrieron 17.8 μ g por carril.

P. M.

X 10^3

1

2

3

4

5

6

64 →

48 →

32 →

16 →

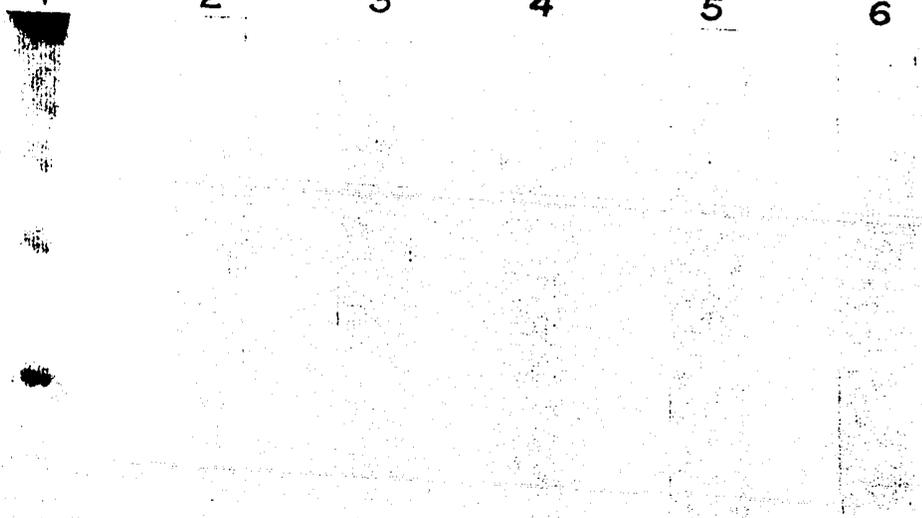


Figura 9. Patrones electroforéticos de la tercera población de Opuntia rzedowskii. En cada carril se corrieron $14.7 \mu\text{g}$ de proteína. La electroforesis se realizó en las mismas condiciones que los geles anteriores, con la diferencia de que se utilizaron otras proteínas como marcadores de peso molecular.

P.M.

$\times 10^3$

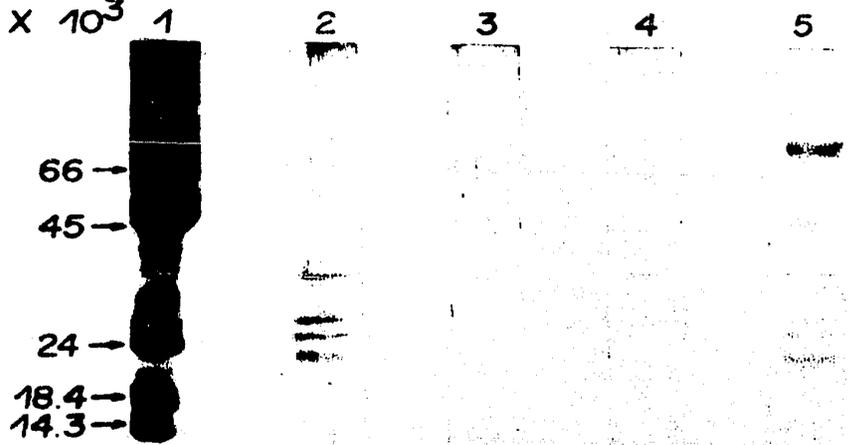


Figura 10. Comparación electroforética de extractos de parénquima de 3 ejemplares de O. robusta var. larreyi (carriles 2 a 4) y 3 ejemplares de O. rzedowskii (carriles 5 a 7). La cantidad de proteína por carril fue de 17.4 μ g. Las condiciones de la técnica electroforética fueron iguales a las indicadas en la figura 4.

P.M.

X 10³ 1

64 →

48 →

32 →

16 →

2

3

4

5

6

7



CONCLUSIONES

- 1) Es la segunda vez, hasta donde se sabe, que se aplica el método analítico de electroforesis de proteínas a extractos derivados de cactáceas.
- 2) Se estudiaron las proteínas del parénquima de los artículos de dos especies silvestres y abundantes en el Pedregal de San Angel: O. robusta var. larrevi y O. rzedowskii.
- 3) La viscosidad de los extractos de parénquima causó problemas de tipo técnico que provocaron la baja resolución de las bandas en los patrones electroforéticos. Sin embargo, ésta fue lo suficientemente buena para analizar los resultados.
- 4) Se observó diferente intensidad de las bandas proteicas de los diferentes carriles, a pesar de colocar en todos la misma cantidad de proteína, de acuerdo al método de Bradford. El problema radicó en 2 puntos: a) la alta viscosidad en los extractos debido a la presencia de mucílago; b) la baja concentración de proteína en los mismos, razón por la que a pesar de ser 10 individuos de cada población, hubo que descartarse los que presentarían baja concentración de proteína.
- 5) La viscosidad pudiera reducirse mediante tratamiento enzimático para reducir el tamaño de los mucopolisacáridos, aunque los costos de operación serían mayores.

- 6) Es altamente recomendable intentar cuantificar la proteína presente en los extractos por otros métodos alternativos como el de Lowry, Biuret, análisis de aminoácidos y encontrar cual es el más adecuado.
- 7) En el presente estudio, se encontró que los patrones electroforéticos de individuos de una misma población son muy semejantes, lo mismo sucedió cuando se compararon las 3 poblaciones de una misma especie. Sin embargo, cuando se compararon las dos especies en estudio, los patrones electroforéticos fueron diferentes.
- 8) Se encontraron dos proteínas de 55 000 y 33 000 daltones de peso molecular, que son comunes a las dos especies estudiadas. Sería interesante realizar un mayor número de experimentos en el mismo género con el fin de observar si éstas bandas proteicas pudieran ser genero-específicas.
- 9) Los patrones electroforéticos obtenidos en geles de poliacrilamida, permitieron distinguir fácilmente entre O. robusta var. larreyi y O. rzedowskii, por la presencia de proteínas especie específicas, como las de 40 000 y 23 000 daltones de peso molecular para la primera especie, y las de 27 000, 25 000 y 22 000 daltones para la segunda. Se recomienda la determinación de las proteínas especie específicas para otras especies de Opuntia, situación que permitiría un seguimiento adecuado en el estudio de los híbridos.

- 10) Los puntos anteriores se analizaron en base a las bandas más notorias, para un análisis similar, empleando las proteínas presentes en menor concentración, sería necesario emplear mayor cantidad de la misma en las muestras a aplicar en el gel.
- 11) Para un mejor control de los resultados, sería interesante trabajar con material biológico obtenido desde la siembra de semillas, sin embargo, para que las plantas lleguen al estado adulto, éste experimento llevaría bastante tiempo además de que se requiere abundante material biológico.
- 12) Los resultados de éste trabajo apoyan los estudios referidos en la bibliografía, de que el empleo de la electroforesis, es una herramienta auxiliar en la taxonomía y demostró su utilidad en el estudio del género Opuntia.
- 13) Es importante mencionar que aunque la electroforesis puede ayudar a la taxonomía, no hay que olvidar que existen otras disciplinas que también pueden ser utilizadas con el mismo fin, esto es, realizar estudios biosistemáticos que ayuden a obtener sistemas de clasificación más completos.

BIBLIOGRAFIA

- ALAGON, A. y L. POSSANI. 1983. Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina, Univ. Nal. Auton. de México, 6, 10: 227-267.
- BACKEBERG, C. 1958-1962. Die Cactaceae. Handbuch der Kaktenkunde. Jena, 6 : 404l.
- BELOVA, T. y D. EFIMOV. 1981. Classification of Precipitates Formed by Meningococcal Group Specific, Antigens During Counter Immuno Electrophoresis. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. Q, 2: 67-71.
- BENSON, L. 1962. Plant Taxonomy. The Ronald Press, New York: 370-375.
- BIOSCA, M., FIGUEIRAS, A. y V. BEROVIDES. 1985. Estudio Electroforético de las Esterasas del Hígado en Pseuemys decussata (Reptilia: Chelonia) de la Ciénaga de Zapata, Cuba. Academia de Ciencias de Cuba: 13.
- BRADFORD, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-253.
- BRAVO, H. 1978. Las Cactáceas de México. Univ. Nal. Auton. de México co. México: 84-138.
- BRITTON, N. y N. ROSE. 1919-1924. The Cactaceae. Carnegie Inst. Washington, 4: 318.
- BROOKS, D. et al. 1984. Principles and Methods of Phylogenetic Systematics: A Cladistics Workbook. University of Kansas, Museum Natural History, 12: 15-19.

- CARLSON, R. y A. VIDAVER. 1982. Taxonomy of Corynebacterium Plant Pathogens Including a New Pathogen of Wheat Based on Poly Acrylamide Gel Electrophoresis of Cellular Proteins. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 3: 315-326.
- COOKE, R. , CLIFF, E. y S. DRAPER. 1983. Barley Cultivar Characterization by Electrophoresis 2. Classification of Hordein Electrophorograms. J. Natl. Inst. Agric. Bot. , 16 , 2: 197-206.
- COOPER, T. 1977. The Tool of the Chemistry. Harper and Row, New York: 194-233.
- COSTAS, M. y A. GRIFFITHS. 1980. The Suitability of Starch Gel Electrophoresis of Esterases and Acid Phosphatases for the Study of Acanthamoeba Taxonomy. Arch. Protistenkd. 123, 3: 272-279.
- CRONQUIST, A. 1968. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Houghton Mifflin, Boston: 260-263.
- CUTTER, E. 1971. Plant Anatomy: Experiment and Interpretation. Addison Wyesley Publ., California: 198- 219.
- EICHLER, A. 1876. Syllabus der Vorlesungen über Phanerogamenkunde Schwerische. Buchhandlung Kiel. Annals of the Missouri Botanical Garden. 64, 2: 210-220.
- FRAIR, W. 1982. Serum Electrophoresis and Sea Turtle Classification Comp. Biochem. Physiol. B. Comp Biochem. 72, 1:1-6.
- FRANSEN, J. y G. NIBARUTA. 1982. Use of Electrophoresis in Fish Taxonomy. Hidrobiología. 88, 3: 289-294.
- GARCIA, C. 1983. Variación de la Expresión Génica Determinada por Perfiles Electroforéticos (SDS) en Proteínas de Múscu-

culo Abductor en dos Poblaciones de Crassostrea corteziensis (Ostreidae) en Sinaloa y Nayarit. Tesis. Facultad de Ciencias, Univ. Nat. Auton. de México: 8-39.

- GOTTLIEB, 1977. Electrophoretic Evidence and Plant Systematics. Ann. Missouri Bot. Gard. 64: 161-180.
- HARBORNE, J. 1968. Biochemical Systematics. The Use of Chemistry in Plant Classification. Reinhold and Liwschitz (eds) New York: 545-588.
- HENRIKSEN, U. y J. JELNES. 1980. Experimental Taxonomy of Biomphalaria. Gastropoda Planorbidae I Method for Experimental Taxonomics Studies on Biomphalaria done by Horizontal Starch Gel Electrophoresis and Stining of 12 Enzymes. J. Chromatogr. 188, 1: 169-176.
- HUNT, R. y N. Taylor. 1986. The Genera of the Cactaceae: Toward a New Consensus. British Cactus Society. 4: 1-21.
- JELNES, J. 1979. Experimental Taxonomy of Bulinus Gastropoda Planorbidae Part 2 Recipes for Horizontal Starch Gel Electrophoresis of 10 Enzymes in Bulinus and Description on Internal Standard Systems and of New Species of the Bulinus-Forskali Complex. J. Chromatogr. 170, 2: 405-411.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- LAURENCO, M. et al. 1981. Study of Human Rotavirus Genome by Electrophoresis Attempt of Classification Among Strains Isolated in France. Ann. Virol. 132, 2: 161-174.

- MATA, R. y J. MCLAUGHLIN. 1982 Cactus Alkaloids 50. A Comprehensive Tabular Summary. Rev. Latinoamer. Quim. 12: 95-117.
- MURPHY, L. 1978. Biochemical Taxonomy of Marine Phyto Plankton by Electrophoresis of Enzymes Part. 2 Loss of Heterozygosity in Clonal Cultured of the Centric Diatoms Skeletonema-Statum and Thalassiosira - Pseudonana. J. Phycol. 14, 3: 247-250.
- NOWICKE, J. 1975. Pollen Morphology Centrospermae. Grana, Washington. 15: 51-77.
- ORR, K. 1979. Use of 2 Mercaptoethanol to Facilitate Detection and Classification of Immunoelectrophoresis. J. Immunol Method. 30, 4: 339-348.
- POSSANI, L. y A. ALAGON. 1983. Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina, Univ. Nal. Auton. de México, México, 6, 6: 125-157.
- RADFORD, A., DICKISON, W., MASSEY, J. y C. RITCHIE. 1974. Vascular Plant Systematics. Harper and Row, New York: 285-305.
- RICKEMAN, U. y S. DESBOROUGH. 1978. Elucidation of the Evolution and Taxonomy of Cultivated Potatoes with Electrophoresis Part I Groups Tuberosum Antigena Phureja and Stenotomum. Theor. Appl. Genet. 52, 5: 217-220.
- SANTAMOUR, C. 1982. Cambial Peroxidase Isoenzyme in Relation to Systematics of Acer. Bolletín of the Torrey Botanical Club. 109, 2: 152-161.
- SCHEINVAR, L. 1982. Las Cactáceas del Valle de México. Tesis. Facultad de Ciencias, Univ. Nal. Auton. de México: 531-533, 664-680.

- SCHEINVAR, L. et al. 1985. Byosistematic Study of Nyctocereus castellanosii Scheinvar, N. serpentinus (Lag. & Rodr.) Br. & Rose and N. splendens (SD. in Lem.) Scheinvar comb. nov. An. Mo. Bot. Gard. (En prensa).
- SCHUMANN, K. 1898. Gesamtbeschreibung der Kakten (Monographia Cactacearum). Neudam: 827.
- SOKAL, R. y P. SNEAT. 1963. Numerical Taxonomy. Freeman, New York: 46.
- STRYER, L. 1975. Bioquímica. Freeman, New York: 264-270.
- TAKHTAJAN, A. 1969. Flowering Plant. Oliver and Boyd, Great Britain: 310-320.
- TARROUX, P. 1983. Analysis of Protein Patterns During Differentiation Using 2 Dimensional Electrophoresis and Computer Multi Dimensional Classification. Electrophoresis. 4, 1: 63-70.
- TCHAN, Y. et al. 1983. Taxonomy of the Azotobacteriaceae Determined by Using by Immunoelectrophoresis. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 2: 147 - 156.
- WADELL, G. 1979. Classification of Human Adenoviruses by Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis of Structural Poly Peptides. Intervirolgy, 11, 1: 47-57.
- WEIER, E. 1980. Botánica. Limusa, México: 389-412.
- WETTER, L. 1982. Isozyme Analysis of Cultured Plant Cells. En: Plant Tissue Cultured Methods. Wetter y Constabell, eds. Research Council of Canada, Saskatoon. 17: 105-111.