

ANALISIS SERO-INMUNOLOGICO DE DIFERENTES  
NIVELES DE ESPECIACION EN *BUFO* DEL  
GRUPO *SPINULOSUS*

por J. M. CEI \*

SUMMARY

**Serum-immunological analysis of different speciation levels in *Bufo* of the spinulosus group.**—Speciation of the *Bufo spinulosus* complex is strikingly demonstrated on its wide area of distribution by means of the antigenic properties of the serum proteins. Serological relationships between different populational groups from Peru, Chile and were studied. Precipitin tests were measured by means of the Libby's Photroner. Percentages above 90 % concern with populational and geographical variation; but under 90 % a real inter-specific relationship can be claimed. The following specific units were stressed: *limensis* Werner, *flavilineatus* (Vellard), *trifolium* Tschudi, *atacamensis* (Ceí), *chilensis* Dum. & Bib., *spinulosus* Wiegmann, *rubropunctatus* Guichenot. The remarkable serological isolation of the so called "*spinulosus*" form from Pampa de Achala, Córdoba, is especially emphasized.

Con la profundización de los métodos de investigación sistemática, por la creciente aplicación de criterios estadísticos taxi-genéticos y por el empleo de técnicas comparativas no morfológicas, la definición ya clásica de la especie se ha ido haciendo cada vez más difícil e incierta. En presencia de una verdadera "impasse semántica", se ha llegado hasta la proposición de una disociación conceptual entre "especies taxinómicas" y "especies biológicas" (Grant, 1963). Numerosas y contrastantes han sido y son las discusiones sobre los aspectos fundamentales de una delimitación real, en el tiempo y en el espacio, de los conjuntos apreciables de individuos relacionados

\* Instituto Biología Animal, Fac. Cienc. Agr., Univ. Nac. Cuyo, Mendoza. .  
Trabajo realizado con ayuda del C.N.I.C.T. (proyecto 1903/a - 67).

inter-se: o por determinados grados de semejanza, o por determinados niveles de intercambio reproductivo debido a flujo génico entre los sistemas integrados alélicos de las así llamadas poblaciones mendelianas. Una tendencia compartida por varios evolucionistas o sistemáticos modernos insiste sobre una crítica demoleadora del significado y hasta de la utilidad práctica del "tipo", y sus variantes, en la clasificación. Otros taxónomos sustentan todavía la eficacia del mismo (Blackwelder, 1964), o por lo menos aceptan su necesaria función nomenclatural (Simpson, 1961). Otros en fin (Reig, 1968), aun negando todo valor lógico intrínseco a las prácticas tipológicas en todas sus derivaciones, admiten la posibilidad de su empleo en el solo caso de materiales de estudio fragmentarios e incompletos, subrayando la conveniencia de enunciar claramente el carácter provisional e hipotético de cada definición, en cada diagnosis.

Es interesante observar en este trabajo algunos resultados de nuestras investigaciones recientes no morfológicas sobre conjuntos poblacionales y subespecíficos de especies politépicas de Anuros neotropicales con amplia dispersión geográfica. Hemos podido comprobar que a través del análisis bio-estadístico y fisiológico de las muestras poblacionales de un conjunto, se llega a veces a una conclusión casi paradójica. En efecto, varias antiguas entidades taxinómicas, creadas por sucesivos autores con procedimientos morfotípicos, y pasadas luego a sinonimia de la especie politépica, parecen reivindicar su primitiva categoría de especie, en el sentido de sistemas genéticos diferenciados y aislados, gracias al mismo criterio biológico de la evaluación de los niveles de intercambio génico como en las experiencias de compatibilidad genética o gracias a la apreciación cuantitativa de la información genética común, como en los tests de precipitinas que permiten evaluar la cantidad de antígenos comunes en las seroproteínas específicas. Resulta entonces sorprendente que métodos que atienden directamente a la objetividad de la especie en su materialización dinámica, espacio-temporal, puedan aplicarse fielmente en ciertos casos a una expresión descriptiva, tildada con los más severos atributos de imprecisión y subjetividad, como la especie morfotípica.

Hemos estudiado un conjunto de formas del género *Bufo*, del grupo *spinulosus*, al cual con buena razón algunos autores

podrían asignar el término, otras veces usado, de super-especie. Estos sapos son prevalentemente cordilleranos y llegan a grandes alturas (hasta 4.500 metros y más), pero en la ladera del Pacífico tocan las orillas del océano (Perú, Chile) no descendiendo más abajo de 1.000 metros hacia el este. Se encuentran desde el sur de Ecuador (Loja) hasta la Patagonia, y su historia taxinómica se desarrolla desde el siglo XVIII, cuando Molina, en Chile (1782) describió muy imperfectamente su *Bufo arunco*, el "Señor de las aguas" de los araucanos. Las entidades específicas del grupo, sucesivamente reconocidas, fueron *spinulosus* Wiegmann (1835), *chilensis* Dum. y Bib. (1841), *trifolium* Tschudi (1845), *rubropunctatus* Guichenot (1848), *limensis* Werner (1897), *cophotis* Boulenger (1900). A nivel subespecífico fueron descritos *flavilineatus* Vellard (1959), *arequipensis* Vellard (1959), *orientalis* Vellard (1959), *atacamensis* Cei (1961), *altiperuvianus* Gallardo (1961), *papillosus* Philippi (in Gallardo!) (1965). Hasta la fecha el status de *spinulosus* ha sido corrientemente considerado como el de una especie politípica, referida a *spinulosus* Werner, con *chilensis* (sinónimo de *arunco* Molina), *trifolium*, *limensis*, *flavilineatus*, *arequipensis*, *orientalis*, *atacamensis*, *altiperuvianus*, *papillosus*, todos en calidad de subespecies o formas geográficas. La posición específica de *rubropunctatus* en Chubut y sur de Chile, ha sido aclarada por Gallardo (1962).

Hemos estudiado serológicamente muestras poblacionales significativas de ese grupo, utilizando como en otros casos las técnicas de las reacciones precipitínicas y su evaluación fotron-reflectométrica, que permite inferir distancias o afinidades taxigenéticas en base a la existencia de mayor o menor cantidad de antígenos comunes en las proteínas séricas, albúmino-globulinas, específicas. Oportunamente se ha tenido en cuenta los ajustes técnicos más recientes, en especial la sincronización de extracción de las muestras de sueros utilizadas en los tests (Cei, Castro, 1969). Para otros detalles sobre obtención de sueros, preparación de sueros inmunes de conejos, y medición galvanométrica de los precipitados nos referimos a trabajos anteriores (cfr. Cei, 1969).

Las poblaciones examinadas fueron las siguientes:

Forma *spinulosus*: Perú - Cuzco, 3.400 m; Chile - Volcán,

Cordillera de Santiago, 2.100 m; Argentina - Cordillera de San Juan, 2.500 m; en la provincia de Mendoza: San Isidro y Puesto Lima, 1.200 m; Paramillo, 2.100 m; Valle Hermoso, 3.000 m; arroyo a 20 km SE de Bardas Blancas, 1.200 m; Co-hueco, cerca de planicie del Payún, 1.800 m; Río Chico, Alto Río Chubut, Río Negro, 1.200 m.

Forma *chilensis*: Chile - Zapallar, Valparaíso, Til-Til y Las Condes, cerca de Santiago.

Forma *limensis*: Huacho, costa al norte de Lima.

Forma *atacamensis*: río Huasco, desierto de Atacama.

Forma *flavilineatus*: lago Junín, Perú, 4.200 m.

Forma *trifolium*: Cumbres de Tarma, Perú, 3.500 m.

Forma *rubropunctatus*: Chile, bosque valdiviano.

También se pudo disponer de muestras de la población aislada de Pampa de Achala, Córdoba (2.100 m) y de la especie dada como afín al grupo, *variegatus* del bosque antártico. Se prepararon 15 sueros inmunes en conejo con antígenos de *spinulosus*, *chilensis*, *atacamensis*, *limensis*, *flavilineatus*, y de la forma aislada de Pampa de Achala. En total, las reacciones precipitínicas realizadas y evaluadas fueron 87.

Los resultados de las reacciones cruzadas, analizados también en otras notas (Cei, 1969), permiten reconocer cuatro niveles fundamentales en las distancias serológicas de las muestras experimentadas, como se desprende por las Tablas I, II, III y fig. 1-6.

Porcentajes de índices precipitínicos homo-heterólogos arriba del 90 % pueden considerarse a un nivel poblacional intra-específico: simples manifestaciones de fluctuaciones génicas, traducidas en recombinaciones cuantitativas de antígenos comunes. Cae en aquellos toda la cadena poblacional de la forma *spinulosus* de Wiegmann, a pesar de su enorme dispersión geográfica, desde el Cuzco, "terra typica", a las orillas del río Barrancas, sur de Mendoza, casi en Patagonia. Lo mismo ocurre entre las poblaciones centro-chilenas de la forma *chilensis* de Dum. y Bib., desde Valparaíso a Santiago.

Porcentajes entre el 70 % y 80 % corresponden a distancias que pueden ser ya de rango específico, luego de un pro-

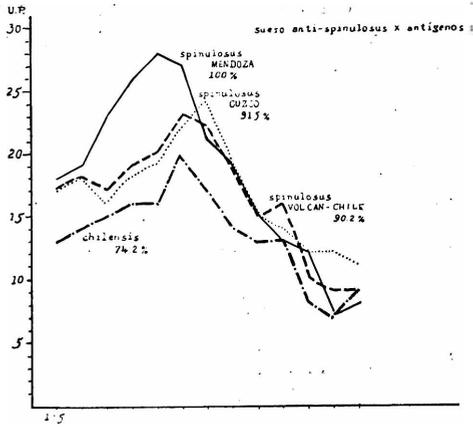


FIGURA 1. — Curvas fotorreflektométricas de las reacciones homo-heterólogas de precipitinas entre un suero anti-spinulosus y sueros de diferentes poblaciones de la misma especie, y de chilensis.

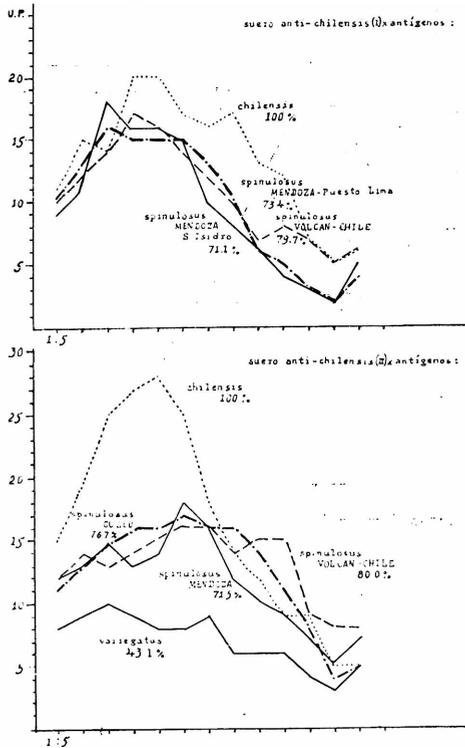


FIGURA 2. — A y B, Curvas fotorreflektométricas de las reacciones homo-heterólogas de precipitinas entre sueros anti-chilensis (I) y (II) y sueros de diferentes poblaciones de spinulosus, y Bufo variegatus.

ceso pretérito de especiación. Esto se verifica entre todas las poblaciones de *spinulosus* por un lado y las de *chilensis* por otro, con un número significativo de combinaciones geográficas y de reacciones cruzadas. El hallazgo resulta en claro contraste con la afirmación de Gallardo (1965) que las poblaciones argentinas de *spinulosus* de San Juan y Mendoza pertenecerían a una supuesta y confusamente definida forma subespecífica

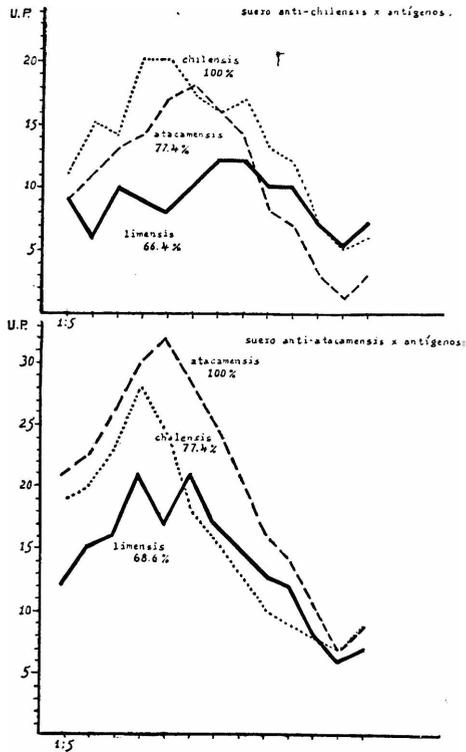


FIGURA 3. — A, curvas fotorefractométricas de las reacciones homo-hetrólogas de precipitinas entre un suero anti-*chilensis* y sueros *atacamensis* y *limensis*. B, idem, entre un suero anti-*atacamensis* y sueros de *chilensis* y *limensis*.

*chilensis* D. y B. Dicha tesis tiene en contra la presente evidencia y no está sustentada por la evidencia morfológica, habiendo encontrado Bogart (com. pers.: trabajo en prensa) diferencias cariotípicas y Martín (com. pers.: en prensa) diferencias osteológicas constantes y características entre los verdaderos *chilensis* de Chile central y *spinulosus* de Mendoza, Argentina.

Los índices precipitínicos subrayan también el grado de aislamiento fisiológico entre *atacamensis* y respectivamente *spinulosus*, *chilensis* y *limensis*. Los curiosos sapos acuáticos de Vallenar y Copiapó pueden haber sufrido un período suficientemente largo de interrupción de intercambios génicos con las poblaciones limítrofes, quizás por razones paleoclimáticas que llegaron a establecer las actuales poderosas barreras ecológicas circundantes. Trabajos en curso de Blair y colaboradores y de Veloso (no publicados) parecen refrendar esta compatibilidad mediante tests cruzados de compatibilidad genética y supervivencia larval y de metamorfosados, relativamente bajas. Diferencias bioquímicas existen en las secreciones de la piel entre todas las formas arriba mencionadas y acentúan su diferenciación sistemática (Cei, Erspamer y Roseghini, 1968). Blair (datos no publicados) observa en fin diferencias significativas en la morfología del testículo de *atacamensis* en comparación con *spinulosus* y *chilensis*.

Otras formas que por su distancia serológica parecen empujadas o devueltas a una categoría taxinómica muy probablemente superior a la de subespecies son *flavilineatus*, *trifolium* y *limensis* de Perú. *Bufo flavilineatus* endémico en el altiplano de Junín acusa fuerte aislamiento con *spinulosus* (75,5 % - 78,2 %), con *chilensis* (62,0 % - 61,2 %), menos con *limensis* (82,3 % - 84,0 %), forma gigante limítrofe, cuya diferencia de tamaño y coloración con el pequeño sapo del altiplano son sorprendentes. La historia evolutiva del grupo en las regiones tropicales andinas es prácticamente desconocida y la misma distribución geográfica puede considerarse imperfectamente trazada, sobre la base de una supuesta alopatría de las formas. Índices ligeramente superiores a 80 %, como se ve por la Tabla 1, pueden señalar una mayor cantidad de antígenos comunes, quizá por procesos de especiación más recientes o por reducidos intercambios génicos debidos a extrema vecindad, o simpatria, de poblaciones limítrofes, lo que parece ser el caso de *spinulosus* y *chilensis* en la región precordillerana frente a Santiago de Chile (El Volcán y Las Condes: 83,2 %). El carácter transicional de las poblaciones cordilleranas de *spinulosus* de El Volcán parece confirmarse por sus índices precipitínicos versus *spinulosus* de Mendoza, relativamente más bajos (89,6 %

- 90,2 % - 90,3 %). La pertinencia al conjunto específico *spinulosus* Wiegmann de las poblaciones de El Volcán se destaca por otro lado por su decidida reacción cruzada con la forma típica del Cuzco (92,1 % - 94,5 %).

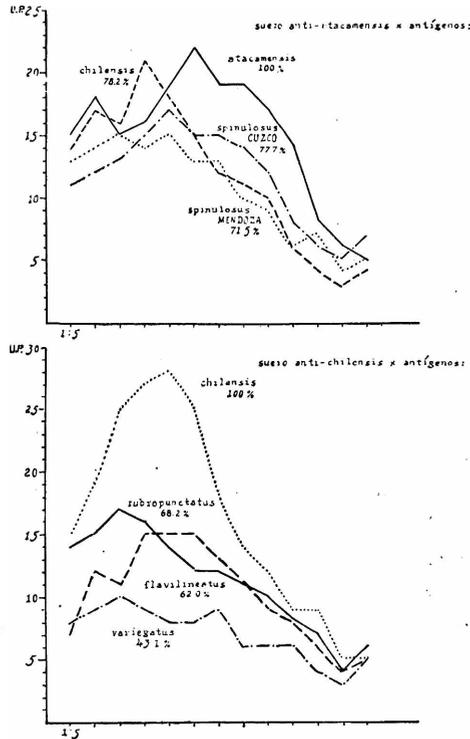


FIGURA 4. — A, curvas fotorefractométricas de las reacciones homo-heterólogas de precipitinas entre un suero anti-*atacamensis* y sueros de *chilensis* y diferentes poblaciones de *spinulosus*. B, ídem, entre un suero anti-*chilensis* y sueros de *Bufo rubropunctatus*, *flavilineatus* y *variegatus*.

Es interesante notar que las distancias serológicas recorridas entre *limensis* y *chilensis*, por ejemplo, o *spinulosus* y *limensis*, son del nivel de la revelada por el test *chilensis* × *rubropunctatus* (68,2 %), especies simpátridas en el bosque antartandico (Gallardo, 1965). Distancias mayores son solamente demostradas por reacciones entre elementos de grupos filéticos diferentes, como se desprende por los valores encontrados con *Bufo marinus poeppigi* (57,1 % con *limensis*; 53,0 % con *fla-*

*vilineatus*). A este propósito cabe poner énfasis sobre el índice precipitínico sumamente bajo hallado entre *chilensis* y *Bufo variegatus* ( $\pm 3,1\%$ ). La posición de *Bufo variegatus* ha sido recientemente discutida por Gallardo (1962), quien ha postulado el origen independiente de aquel stock de bufónidos, contrapuesto a los demás elementos neotropicales. No es aquí el lugar para analizar o criticar esa tesis extrema, pero sin duda

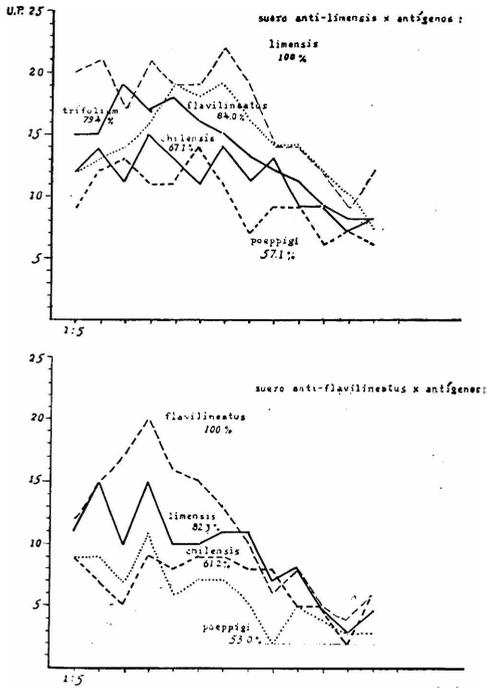


FIGURA 5. — A, curvas fotorefractométricas de las reacciones homo-heterólogas de entre un suero anti-limensis y sueros de *flavilineatus*, *trifolium*, *chilensis* y *Bufo poeppligi*. B, ídem, entre un suero anti-flavilineatus y sueros de *limensis*, *chilensis* y *Bufo poeppligi*.

el único dato serológico en nuestro poder no conforta de ninguna manera la posibilidad de una estrecha vinculación filética de *variegatus* con las demás formas del conjunto super-específico de *spinulosus*.

Otro aporte novedoso de nuestras investigaciones se debe considerar el inequívoco aislamiento genético que se evidencia en todos los tests serológicos donde figura la forma de la

Pampa de Achala, cuya posible separación taxinómica ha sido sospechada por Hellmich (1936) y por Gallardo (1965). La distancia entre la forma de la Pampa de Achala y las poblaciones mendocinas y rionegrenses de *spinulosus* es del mismo nivel de al reinante entre *spinulosus* y *atacamensis*, o *spinulosus* y *chilensis*; con *chilensis* los índices bajan aún más, entre 64,7 % y 67,5 %. En base a un criterio comparativo deductivo según nuestra discusión anterior, la forma de la Pampa de Achala alcanzaría pues serológicamente una categoría específica, y las condiciones de verdadera segregación topográfica

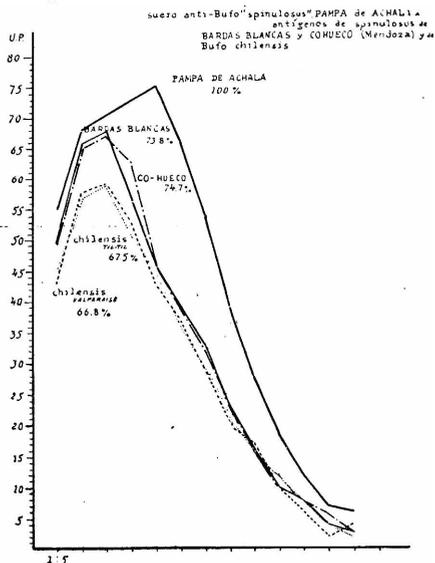


FIGURA 6. — Curvas fotoneflectométricas de las reacciones homo-heterólogas de precipitinas entre un suero anti-Bufo del grupo *spinulosus*, de Pampa de Achala, Córdoba y sueros de diferentes poblaciones de *spinulosus* (Mendoza) y *chilensis* (Chile).

de ese bufónido en las cumbres cordobesas deben haber actuado durante un período muy largo para llegar a consecuencias fisiológicas de tal envergadura.

En resumen: Sobre la base del cuadro aquí trazado de las afinidades serológicas poblacionales de la superespecie *spinulosus* aparece como un conjunto de formas de antiguo abolengo filético, seguramente anterior al movimiento orogénico andino y sometidas a diferentes etapas de especiación, sugeridas

por los niveles de diferenciación antigénica actuales. Una primera etapa puede considerarse la de *rubropunctatus*, de *limensis* y respectivamente *chilensis-atacamensis* y *spinulosus*. Una segunda etapa puede haber marcado la separación de *spinulosus* y *chilensis* y el aislamiento de la forma de la Pampa de Achala; luego la separación de *atacamensis*, y en el norte de *flavilineatus* y *trifolium*. Como el mítico Ouroboros de los antiguos griegos, la serpiente mística que se muerde la cola, los morfo-tipos originarios de Tschudi, Duméril, Bibron y Werner podrían volver curiosamente a su primitivo rango, esta vez con la dignidad de especies biológicas, junto con las subespecies de Vellard y Ceí. Por otra parte, a pesar del interés que opinamos pueda merecer esta contribución no morfológica a la elucidación de una entidad herpetológica regional y al planteo dialéctico del concepto de especie, es indispensable obtener datos más completos sobre la distribución, ecología y fisiología de varias de las formas citadas y de otras que todavía escaparon a nuestro tamiz sistemático, antes de dar por concluido el problema taxigenético del conjunto *spinulosus*.

TABLA I. — REACCIONES CRUZADAS DE PRECIPITINAS, MEDIDAS EN U.P.  
(PORCENTAJES HOMO-HETERÓLOGOS, DE ÁREAS TOTALES INTEGRADAS).

Grupo *spinulosus*

ARRIBA DEL 90 %

Forma <i>spinulosus</i> : poblaciones Perú, Cuzco, versus Men-		
doza y recíprocas:		90,2-91,5
„ Perú Cuzco, versus Volcán,		
Chile y recíprocas:		92,1-94,5
„ Mendoza, San Isidro, ver-		
sus Volcán, Chile:		90,2
„ Mendoza, Paramillo, versus		
Volcán, Chile:		90,3
„ Mendoza, San Isidro, ver-		
sus Mendoza, Puesto Lima:		93,2
„ Mendoza, Paramillo, versus		
San Juan, Cordillera:		91,4
„ Mendoza, Bardas Blancas,		
vs. San Juan Cordillera:		94,7
„ Mendoza, Paramillo, versus		
Mendoza, Co-huecó:		94,4
„ Mendoza, Bardas Blancas,		
versus Mendoza, Co-huecó:		98,1
Forma <i>chilensis</i> : poblaciones Valparaíso versus Til-Til,		
Santiago:		96,7
„ Las Condes, Santiago, ver-		
sus Valparaíso:		97,7

ARRIBA DEL 80 %

Poblaciones <i>spinulosus</i> Volcán, Chile, versus <i>spinulosus</i> ,		
„ Mendoza, San Isidro:		89,6
„ <i>chilensis</i> Las Condes, Santiago, versus <i>spinu-</i>		
<i>losus</i> , Volcan, Chile:		83,2
„ <i>spinulosus</i> Volcán, Chile, versus <i>chilensis</i> , Za-		
pallar y recíproca:		81,1-80,0
„ forma Pampa de Achala, versus <i>spinulosus</i> ,		
Mendoza, Paramillo:		82,1
„ <i>atacamensis</i> Vallenar, versus <i>spinulosus</i> , Perú,		
Cuzco:		81,6
„ <i>limensis</i> Perú, versus <i>flavilincatus</i> , Perú y re-		
cíproca:		84,0-82,3

TABLA 2. REACCIONES CRUZADAS DE PRECIPITINAS, MEDIDAS EN U.P. (PORCENTAJES HOMO-HETERÓLOGOS, DE ÁREAS TOTALES INTEGRADAS).

Grupo <i>spinulosus</i>		
ARRIBA DEL 70 %		
Forma <i>spinulosus</i>	Perú, Cuzco, versus <i>chilensis</i> , Zapallar y recíproca:	76,4-76,7
" "	Perú, Cuzco, versus <i>atacamensis</i> , Vallenar y recíproca:	77,2-77,7
" "	Mendoza, Paramillo, versus <i>chilensis</i> , Valparaíso y recíproca:	71,1-71,7
" "	Mendoza, Paramillo, versus forma Pampa de Achala:	79,3
" "	Mendoza, San Isidro-A, vs. <i>chilensis</i> , Zapallar y recíproca:	74,2-71,5
" "	(73,4 con Mza., Puerto Lima). Mendoza, San Isidro-B, vs. <i>chilensis</i> , Zapallar y recíproca:	70,3-71,1
" "	Mendoza, Bardas Blancas, versus <i>chilensis</i> , Valparaíso:	74,1
" "	Mendoza, Bardas Blancas, versus forma Pampa de Achala y recípr.:	76,7-73,8
" "	Mendoza, San Isidro, versus <i>atacamensis</i> , Vallenar y recíproca:	73,7-71,5-72,1
" Pampa de Achala	versus <i>spinulosus</i> Volcán, Chile:	78,9
" "	versus <i>spinulosus</i> Mendoza, Valle Hermoso:	71,0
" "	versus <i>spinulosus</i> Mendoza, Co-huecó:	74,7
" "	versus <i>spinulosus</i> Río Negro: Valparaíso, vs. <i>spinulosus</i> Mendoza, Co-huecó:	73,5
" <i>chilensis</i>	Las Condes, Santiago, versus <i>spinulosus</i> Mendoza, Paramillo:	73,3
" "	Las Condes, Santiago, versus <i>spinulosus</i> Mza., Bardas Blancas:	75,2
" "	Vallenar, versus <i>chilensis</i> , Zapallar y recíproca:	74,2
" <i>atacamensis</i>	Vallenar, versus <i>spinulosus</i> , Volcán, Chile:	77,4-78,2-77,4
" "		71,7
" <i>limensis</i>	Perú, versus <i>trifolium</i> , Perú:	79,4
" "	Perú, vs. <i>atacamensis</i> , Vallenar:	70,3
" "	Perú, versus <i>spinulosus</i> , Perú,	
" <i>flavilineatus</i>	Cuzco:	78,2
" "	Perú, versus <i>spinulosus</i> , Mendoza, San Isidro:	75,5

TABLA 3. REACCIONES CRUZADAS DE PRECIPITINAS, MEDIDAS EN U.P. (PORCENTAJES HOMO- HETERÓLOGOS, DE ÁREAS TOTALES INTEGRADAS).

Grupo *spinulosus*

## MENOS DEL 70 %

Forma <i>spinulosus</i> , Mendoza, San Isidro, versus <i>limensis</i> , Perú y recíproca:	66,1-63,9
„ Pampa de Achala versus <i>chilensis</i> , Til-Til, Sgo.:	67,5
„ „ „ versus <i>chilensis</i> , Valparaíso y recíproca:	66,8-64,7
„ <i>chilensis</i> , Las Condes, Santiago, versus forma Pampa de Achala:	68,7
„ <i>atacamensis</i> , Vallenar, versus <i>limensis</i> , Perú:	68,6
„ <i>limensis</i> , Perú, versus <i>chilensis</i> , Zapallar y recípr.:	67,1-66,4
„ <i>chilensis</i> , Zapallar, vs. <i>rubropunctatus</i> , Valdivia:	68,2
„ <i>chilensis</i> , Zapallar versus <i>flavilineatus</i> , Perú y recíproca:	62,0-61,2
„ <i>chilensis</i> , Valparaíso, versus <i>spinulosus</i> , Mendoza, Valle Hermoso:	69,1
„ <i>chilensis</i> , Valparaíso, versus <i>spinulosus</i> , Río Negro:	68,5
„ <i>limensis</i> , Perú, versus <i>marinus poeppigi</i> , Perú:	57,1
„ <i>flavilineatus</i> , Perú, versus <i>marinus poeppigi</i> , Perú:	53,0
„ <i>chilensis</i> , Zapallar, versus <i>variegatus</i> , Valdivia:	43,1

## BIBLIOGRAFÍA

- BLACKWELDER, R. E., 1964. Phyletic and phenetic versus omnispective classification. Phenetic and Phylogenetic Classification, 17-35. Publ. Syst. Ass., 6:164 pp.
- BOULENGER, G. A., 1900. Description of new Batrachians and Reptiles collected by Mr. P. O. Simons in Peru. Ann. Mag. nat. Hist., 7, Ser. VII:18-186.
- CEI, J. M., 1961. *Bufo arunco* (Molina) y las formas chilenas de *Bufo spinulosus* Wiegmann. Investnes zool. chil., 7:59-81.
- CEI, J. M., 1970. Relaciones serológicas entre los *Leptodactylus* del grupo *ocellatus-chaquensis* de la cuenca Chaco-paranense y la forma *macrosternum*. Acta zool. lilloana (Actas II<sup>a</sup> Jorn. argent. Zool., I), 27:297-306.
- CEI, J. M., 1971. Análisis sero-inmunológico de la variación geográfica en el conjunto poblacional de *Bufo arenarum*. Acta zool. lilloana (Actas II<sup>a</sup> Jorn. argent. Zool., II) 28:163-173.

- CEI, J. M. y M. P. CASTRO, 1970. Correlación entre tiempo de conservación y pérdida proporcional de poder antigénico en sueros de Anuros. *Acta zool. lilloana (Actas IIº Jorn. argent. Zool., I)*, 27:25-36.
- CEI, J. M., V. ERSPAMER y M. ROSEGHINI, 1968. Taxonomic and evolutionary significance of biogenic amines and polypeptides in amphibian skin. II. Toads of the genera *Bufo* and *Melanophryniscus*. *Syst. Zool.*, 17(3):232-245.
- DUMERIL, A. M. C. et G. BIBRON, 1841. *Erpétologie Générale*, 8º, Paris, 1841, p. III + 792.
- GALLARDO, J. M., 1961. Three new toads from South American: *Bufo manicorensis*, *Bufo spinulosus altiperuvianus* and *Bufo quechua*. *Breviora*, 141:1-8.
- GALLARDO, J. M., 1962. A propósito de *Bufo variegatus* (Gunther) sapo del bosque húmedo Antartándico y las otras especies de *Bufo* neotropicales. *Physis*, Bs. As., 23, 64:93-102.
- GALLARDO, J. M., 1965. Especiación en tres *Bufo* neotropicales (Amphibia, Anura). *Papéis Dep. Zool.*, S. Paulo, 17:57-75.
- GRANT, V., 1963. *The origin of adaptations*. New York and London, Columbia Un. Press. 606 pp.
- GUICHENOT, A., 1848. En Gay Cl.: *Reptilia et Pisces. Historia física y política de Chile, Zoología*, 2, 1848. (Atlas: *Erpétologie*, 1854.)
- MOLINA, G. I., 1782. *Saggio sulla Storia del Chili*, 2, Ed. Bologna 1810, p. 1-306, 1 map.
- MUELLER, L. y W. HELLMICH, 1936. *Amphibien und Reptilien. I-Teil: Amphibia Chelonia, Loricata*. In: *Wissenschaftliche Ergebnisse der Deutschen Gran Chaco Expedition*. Stuttgart, 1-120, Taf. 1-VIII.
- REIG, O. A., 1968. Los conceptos de especie en la Biología. *Edic. Univ. Central Venezuela, Col. Las Ciencias*, 43 pp.
- SIMPSON, G. G., 1961. *Principles of animal taxonomy*. New York, Columbia Univ. Press, 247 pp.
- TSCHUDI, J. J., 1844-46. *Untersuchungen über die Fauna Peruana*, St. Gallen.
- VELLARD, J., 1959. Estudios sobre Batracios Andinos. V. El género *Bufo*. *Mems. Mus. Hist. Nat. "Javier Prado"*, 8:1-48.
- WERNER, Fr., 1897. Die Reptilien und Batrachien der Sammlung Plate. (Fauna chilensis). *Zool. Jber. Neapel, Sppl.* 4, 1:244-278.
- WIEGMANN, A. F. A., 1835. Beiträge zur Zoologie gesammelt auf einer Reise um die Erde, von Dr. F. J. F. Meyen. Sieben Abhandl. Amphibien. *Nova Acta Acad. Caesar. Leop. Carol.*, 17:183-268.