

JOSÉ M. CEI

COLECCION HERPETOLOGICA
Y BIBLIOTECA
Dr. José Miguel Ceí

Métodos no Morfológicos en la Taxonomía y Filogenia

*Tirada especial
del Autor*

SEPARATA DEL TOMO VI, Nº 17,
DE

HOLMBERGIA

*revista
del centro
de estudiantes
de ciencias naturales*

PERU 222 - BUENOS AIRES - Argentino

JOSÉ M. CEI

BIBLIOTECA
JORGE D. WILLIAMS

Métodos no Morfológicos en la Taxonomía y Filogenia

*Tirada especial
del Autor*

SEPARATA DEL TOMO VI, Nº 17,
DE

HOLMBERGIA

*revista
del centro
de estudiantes
de ciencias naturales*

PERU 222 - BUENOS AIRES - Argentina

GRÁFICA P. IX
Buenos Aires, 15-III-1962

BIBLIOTECA
JORGE D. WILLIAMS

Métodos no morfológicos en la Taxonomía y Filogenia

Por JOSÉ M. CEI *

ABSTRACT. — It is considered here how serology can be used for the determination of the macrosystematic and macroevolution of the major groups, and examples are given of those results which are coincident with the embryological and anatomical ones. It is also summarized here its application in microsystematic and the need of development of methods for the individualization of proteins in their biosystematic behaviour. Of these, it is summed the most tiresome direct qualiquantitative method and with some more detail the immunological and physicochemical methods (electrophoretic and chromatographic); among them it is remarked the impulse given by the "Photronreflectometer" of Libby and the "Serum Agar Measuring Integrator" of Glenn for the measurements of the immunological reactions. Mention is made of the great specificity of seroproteins, to which the application of electrophoretic methods permits intraspecific determinations, culminating with the essay of an electrophoretic systematic key. Finally the author remarks that the great precision and specificity of chromatographic methods has enabled achieving the separation of proteinic aminoacids with the isolation of a sexual peptid characteristic of the *Drosophila melanogaster* males.

Todos los seres vivientes se han reconocido y clasificado desde la anti-güedad por su forma o estructura, desde el aspecto general, hasta los órganos y tejidos que los integran, cuyo cotejo y análisis crítico lleva a las conclusiones sintéticas de la Anatomía Comparada.

En la realidad, un organismo es un proceso continuo cuatridimensional, y la materia viviente que lo compone, resulta sometida a una serie sucesiva e ininterrumpida de transformaciones desde el comienzo hasta el fin de toda existencia individual. Así, lo que llamamos descriptivamente estructura de un organismo corresponde en alguna manera a una **sec-**

* Director del Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

ción en el **espaciotiempo** de su realidad biológica, que nos **fija** como en una foto, pero en las tres dimensiones espaciales dominadas por nuestra observación, una de sus fases dinámicas particularmente significativa. Esto es tan verdadero, que para una efectiva confrontación sistemática de formas afines o de probable descendencia común en el curso de su evolución o filogenia, son indispensables los datos comparativos del desarrollo embrionario y de todos los estadios que lo siguen, hasta el adulto.

La morfología, afinando sus medios técnicos de examen, ha ido alcanzando niveles siempre más profundos de la organización íntima de cada ser. Si la lupa aclara la exacta posición de un órgano, el microscopio revela las células que lo componen; pero la microscopía electrónica ya pasa al nivel de las macromoléculas, armazón substancial de toda arquitectura celular. A un nivel apenas inferior llegamos a las "unidades" fundamentales de la materia viviente, las moléculas proteicas, cuya constitución y cuyas propiedades estructurales químicas son la base de la organización morfológica, y se consideran características en todos los grupos identificados de los seres vivos, o taxones. En última instancia, las diferencias morfológicas que permiten reconocer y clasificar los organismos, derivan de su naturaleza química y de las propiedades funcionales de las moléculas y supermoléculas que los integran, cuya constancia y peculiaridad en las distintas especies son controladas por genes. El mecanismo cromosómico de inducción hereditaria acondiciona su formación, interacción y ciclo bioquímico.

Nos damos fácilmente cuenta de que en su esfuerzo por alcanzar los límites máximos de resolución, el mismo estudio de la forma lleva al encuentro de los factores intrínsecos elementales, de la especificidad, las moléculas proteínicas; pero su delicada y compleja textura, y su equilibrio dinámico, que son la esencia misma de la vida desde su origen (RAPOPORT, 1959), no permiten la aplicación de los criterios estáticos o descriptivos de la observación y comparación clásica. Surge, pues, la necesidad de utilizar métodos que por vías indirectas, no morfológicas, puedan captar la realidad biológica de los constituyentes moleculares específicos, aprovechándolos como dato objetivo y como elemento crítico en la discusión de las relaciones filéticas y de jerarquía entre taxones.

En obras como las de BALDWIN (1937) y de FLORKIN (1944) ha sido planteada de manera amplia y elegante la necesidad de considerar en la sistemática, al lado de los caracteres clásicos, anatómicos y embriológicos, también los caracteres químicos, que están de acuerdo con la fisiología y ecología de los taxones, y presentan a veces evidentes cadenas evolutivas, en armonía con las categorías zoológicas. FLORKIN cita, entre

varios ejemplos, la **recapitulación** de la excreción nitrogenada en las Aves, **uricotélica** en los adultos; pero, durante la vida embrionaria, sucesivamente **amoniotélica**, como en los Invertebrados marinos, y **ureotélica**, como en los anfibios. También discute la aplicación de ciertas leyes generales de la evolución, como la de irreversibilidad, o de DOLLO-DÉPERET, a la ortogénesis de los sistemas bioquímicos en taxones de grado elevado: por ejemplo, la presencia de los **fosfágenos** que actúan en la fosforilación del glucógeno en Invertebrados y Vertebrados. Si los Invertebrados en general poseen **fosfoarginina**, y los Vertebrados, **fosfocreatina**; entre los Equinodermos aparecen ambos **fosfágenos** en los *Echinoidea*, y la **fosfocreatina** en los *Ophiuroidea*; mientras que en los Procordados, los Tunicados conservan la **fosfoarginina**, pero los Hemicordados poseen ambos **fosfágenos**, y los Cefalocordados (Acrañados), sólo la **fosfocreatina**. En las larvas de los *Echinoidea*, como recapitulación ontogénica, la arginina precede la formación de la creatina. Según este esquema bioquímico, y según la ley de Dollo, se puede aceptar una filiación de Hemicordados, Cefalocordados o Vertebrados de los Equinodermos; pero no una hipotética filiación de los Tunicados de los Hemicordados o Cefalocordados. Más difícil resultaría negar con este argumento, decididamente, otras discutidas hipótesis filéticas, como la antigua y combatida idea de la descendencia de los Cordados de los Anélidos (GAVRILOV, 1959).

En esos casos —según observa oportunamente el autor—, la evolución irreversible de un sistema bioquímico, a pesar de no aportar un propio elemento de juicio decisivo a problemas de filogenia, es útil para refrendar o no la posición de otras teorías fundamentadas por la Embriología y Anatomía.

Es notable el esbozo de clasificación bioquímica dado por FLORKIN para varios taxones: Vertebrados, Tunicados, Ciclostomos, Elasmobranquios, Sipuncúlidos e Insectos. La presencia de **hemeritrina** en los hematíes del líquido celómico de *Sipunculus* o *Phascolosoma*, las peculiaridades de los esteroides de la bilis de los Elasmobranquios (escymnones), las características de la hemoglobina (eritrocruorina) o las propiedades fisicoquímicas de las seroproteínas de los Ciclostomos, son indicados como caracteres de jerarquía y significado no inferior a los ofrecidos por el estudio comparativo del esqueleto o de los órganos internos.

Si la Bioquímica Comparada, a grandes rasgos, puede servir de auxilio en la Macrosistemática y en la Macroevolución, en taxones de categoría inferior, desde hace mucho tiempo la atención fue más bien polarizada por las moléculas proteínicas, que definimos como altamente es-

pecíficas por su composición y estructura. Para individualizarlas en su significado biosistemático se han intentado distintos métodos.

El método directo, cualicuantitativo, por análisis comparativo de las proteínas purificadas, en función de los aminoácidos que las integran y de su posición en la molécula, resulta sin duda un proceso sumamente arduo y laborioso, y muy pocas proteínas han sido actualmente estudiadas para pensar en aplicaciones prácticas. Recordaremos, por analogía, los esfuerzos que se realizan actualmente para establecer la periodicidad de la composición de otras sustancias también altamente específicas y de gran importancia para la herencia, los ADN, o **ácidos desoxirribonucleicos**, estructuralmente ya bastante conocidos. Ulteriores adelantos en el estudio de la secuencia de los **nucleótidos** en la larga espiral del ADN podrían, en efecto, significar un paso definitivo hacia la resolución de lo que los investigadores interesados llaman **código** o **clave** de la transmisión genética de estas sustancias fundamentales para la determinación o inducción química de los caracteres específicos (KORNBERG, 1960).

Otros métodos se han ido desarrollando, igualmente dirigidos a las proteínas más características, a la vez para evidenciar su comportamiento fisicoquímico peculiar, y su intervención como sustrato en las reacciones biológicas específicas. Los resultados conseguidos, que brevemente recordaremos, subrayaron el interés creciente de estas técnicas, por las consideraciones siguientes: Las proteínas específicas son las estructuras moleculares íntimas que permanecen prácticamente inalteradas, a pesar de todas las transformaciones morfológicas experimentadas durante la existencia de un organismo. Por otra parte, han sufrido en el tiempo, tanto como los caracteres morfológicos, procesos evolutivos en sus moléculas, cuyas trazas filogenéticas pueden comparativamente revelarse en sus distintas normas de reacción.

El significado sistemático de las proteínas ha sido estudiado principalmente con métodos inmunológicos, y con métodos fisicoquímicos, como la electroforesis y la cromatografía.

KRAUS (1897) fue el primero que descubrió que una sustancia específica, o antígeno, podía provocar en un suero de otra especie una reacción peculiar (reacción inmunitaria), con formación de otras sustancias (anticuerpos, antisuero) capaces de neutralizarla; por ejemplo, con una reacción de precipitación. Se pensó en un primer momento (KRAUS; ESCHISTOVICH, 1899) que esta reacción era "exclusiva" para cada especie; pero pronto BORDET (1899) comprobaba que un suero **antigallo** producido en el conejo reaccionaba intensamente con el suero de gallo (reacción homóloga), pero también, **aunque débilmente**, con el

siero de paloma (reacción heteróloga). Este importante dato fue luego exhaustivamente confirmado por NUTTALL y colaboradores, desde 1901, reconociéndose que la intensidad relativa de las reacciones de precipitación era directamente paralela a la posición o "distancia" sistemática entre las especies de las cuales procedían los antígenos. A pesar del enorme trabajo de NUTTALL (más de 16.000 ensayos, sobre 500 especies), en una primera fase los resultados zoológicos no alcanzaron una sensibilidad muy elevada, a raíz de las técnicas empleadas durante varios años, como las reacciones de floculación y de zona, fundadas sobre la mezcla de una

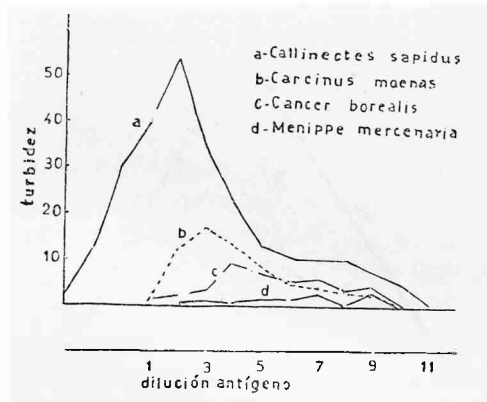


Figura 1

Curvas de la reacción de precipitación entre suero anti-*Callinectes sapidus* con diluciones distintas de antígenos (sueros) de *Callinectes sapidus* y otros Crustáceos. La turbidez se expresa en unidades del Photonreflectometer; la dilución 1 corresponde a una parte de hemocianina en 500 partes de "buffer", cada dilución sucesiva correspondiendo a una concentración mitad de la anterior. (Esquemático según ALAN BOYDEN, 1943.)

cantidad constante de antisuero con antígeno progresivamente diluido, hasta conseguir una "titulación" correspondiente a la más alta dilución de antígeno todavía capaz de provocar precipitados. Las investigaciones se multiplicaron sucesivamente, y los métodos se fueron perfeccionando, especialmente por las investigaciones de KOLMER, WELLS, WU, FUJIIWARA, ULHENHUTH, LANDSTEINER, LEVINE, FORSTER, HEIDELBERGER y muchos otros. Además de las seroproteínas, se experimentó con seguridad el valor altamente específico, en los Vertebrados, de las proteínas musculares, del fibrinógeno, de las hemoglobinas, de las proteínas del huevo y de la leche; en los Invertebrados, de las hemocianinas.

En una revista sintética ya ERHARDT (1929) exponía las contribuciones de la Serología a la Sistemática zoológica; y las relaciones filéticas entre mamíferos a través de las precipitinas encontraban satisfactoria expresión en los esquemas tridimensionales de BOYDEN (1926; 1932). La reacción de zona se demostraba útil para aclarar la incierta posición de los Urodelos Perennibranchios *Siren* y de *Necturus*, que resultaban alejados de *Cryptobranchus*, y se consideraban entonces formas más bien especializadas que primitivas (BOYDEN y NOBLE, 1933).

Un impulso especial a la Sistemática inmunológica fue dado desde 1938, con la aparición del "Photronreflectometer", realizado por LIBBY,

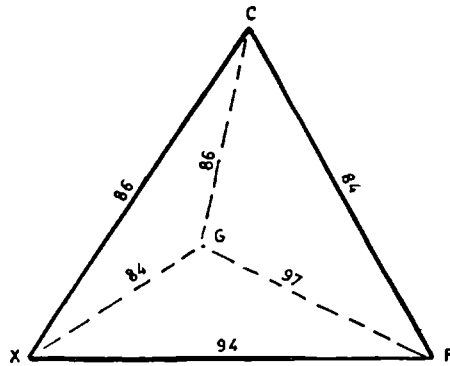


Figura 2

Esquema tridimensional, visto en proyección, de las distancias serológicas (proporcionales a los números) entre algunas familias de Crustáceos: P, *Portunidae* (*Callinectes*, *Carcinus*); X, *Xanthidae* (*Menippe*); C, *Cancridae* (*Cancer*); G, *Goneplacidae* (*Geryon*). (Según ALAN BOYDEN, 1943.)

y gracias a la actividad del grupo de investigadores encabezados por ALAN BOYDEN, y coordinados por el Serological Museum of New Brunswick, donde se han juntado actualmente miles de muestras de sueros y proteínas de las más diversas especies, y se ha fabricado un elevado número de antisueros.

El "Photronreflectometer" es un aparato muy sensible, que proporciona lecturas galvanométricas, por intermedio de células fotoeléctricas, proporcionales al contenido relativo de precipitado en suspensión, en la reacción **antígeno-antisuero**. Opera por reflexión de la luz por las partículas en suspensión; pero puede usarse también por transmisión de la luz, es decir, como turbidímetro. Empleando diluciones progresivas del antígeno, se obtienen curvas muy exactas, en función del valor de la turbidez (o intensidad de la reacción) y del título del antígeno empleado. Estas

curvas, como aparece en la figura 1, están en relación con la posición taxonómica, o mejor dicho el "parentesco" de las especies u otros taxones comparados. Una expresión cuantitativa de la afinidad recíproca puede ser dada por la relación porcentual entre las áreas correspondientes a dichas curvas (fig. 2).

Toda una serie de interesantes investigaciones —la mayoría, utilizando el "Photronreflectometer" de LIBBY—, da la pauta de la utilidad e interés de las técnicas inmunológicas para abordar los numerosos problemas que atañen todavía a la posición de un gran número de taxones en cada clase, orden y familia de animales, así como desde 1945 ha ido señalando SIMPSON en los mamíferos, y como, por ejemplo, se desprende por trabajos recientes en otros grupos, como los batracios (REIG, 1958). BOYDEN y GEMEROY (1950) establecieron que los Cetáceos presentan mayor afinidad con los Artiodáctilos que con cualquier otro orden existente de Mamíferos; también se demostró que los representantes del antiguo orden *Edentata*, separados por SIMPSON (1945), justifican serológicamente su aislamiento en órdenes distintos, *Pholidota* (*Manis*), *Tubulidentata* (*Orycteropus*), *Edentata* (*Dasypus*), siendo entre ellos más afines *Pholidota* y *Tubulidentata*; relaciones sistemáticas en las Aves fueron aclaradas por DE FALCO (1942); en los Peces, por GEMEROY (1943) y RECHNITZER (1955); en Crustáceos e Insectos, por BOYDEN (1943), CUMLEY (1940) y LEONE (1947-1950); en los Moluscos y otros grupos, por WILHELMI (1944), etcétera. El mismo significado práctico de estas observaciones puede subrayarse por los datos referidos por DE FALCO (1952). Estando en discusión el verdadero reservorio malarígeno de la infestación del vector *Anopheles concolor* en el Congo, los restos de sangre del estómago de 362 mosquitos dieron reacciones exclusivamente con el antisuero para el antílope "Oribi", permitiendo establecer la real forma silvestre preferentemente atacada por el mosquito, y reservorio natural del hemozoario. Otro dato llamativo es el referido por BOYDEN (1942). Proteínas extraídas de Mamut congelados por milenios de las tundras de Siberia, dieron evidente reacción con el suero anti-efefante índico, no con *Loxodonta africana*, revelando por vía inmunológica la afinidad de la forma especializada fósil. Aparecen, en fin, muy notables los resultados de WILHELMI (1942), quien encuentra que los Cordados se acercan más serológicamente a los Equinodermos que a todo otro phylum. Es sorprendente la analogía con lo que anteriormente recordamos con respecto a la evolución bioquímica de los fosfógenos en estos animales. No es posible extenderse más sobre la abundante literatura serológica de los últimos años, desde la revisión de LANDSTEINER (1947). Quiero sólo men-

cionar la aplicación de estos métodos por TYLER (1955) a los problemas de la ontogénesis; las importantes contribuciones, aun genéticas, de IRWIN, CUMLEY, COLE y otros sobre las características antigénicas de los eritrocitos de *Columbidae* (1947-1952); los trabajos con análogo enfoque de MAINARDI en las Aves de Europa (1957-1959), y hasta la utilización de las técnicas anafilácticas para descubrir antígenos específicos, desde los primeros ensayos de SERENI en los Gádidos (1931) a los "tests" propuestos por CAMPBELL y McCASLAND (1944). El progreso de los medios de medición y experimentales se destaca por su adelanto. OUDIN (1952-1955) ha perfeccionado el procedimiento en columna de agar, que permite la difusión progresiva y fraccionada de los antígenos y la separación selectiva de las zonas de mayor densidad de precipitados, de acuerdo con la distinta concentración de los anticuerpos. Esta técnica ha encontrado luego la más cuidadosa expresión analítica a través de las medidas fotométricas del Serum Agar Measuring Integrator (SAMI) de GLENN (1956-1957), dotado de registro automático, que traza directa y sincrónicamente las curvas correspondientes a la mayor o menor densidad óptica de las zonas de precipitados examinadas en la columna de agar. Por su sencillez y exactitud, es muy utilizado actualmente el método en placas de agar de Ouchterlony: la lenta difusión de los antígenos y antisueros, ubicados a regulares intervalos en la placa de gel, provoca, según sus características específicas, líneas más o menos intensas de precipitación, cuyo número e intensidad son elementos comparativos de juicio para apreciar grados distintos de afinidad serológica entre taxones.

Nos referimos ahora a otros procedimientos, no inmunológicos, destinados a otros aspectos de la especificidad proteínica. REICHERT y BROWN (1909) establecieron, por ejemplo, que las hemoglobinas de animales distintos cristalizan con formas y ángulos peculiares, cuyas diferencias aumentan paralelamente a la distancia zoológica entre las especies ensayadas. Diferencias sistemáticas resaltaron hasta en el estudio espectrofotométrico, en las determinaciones de solubilidad y en la evaluación del peso molecular (ultracentrifugación) de hemoglobinas y hemocianinas. Desde la conversión de la electroforesis en método analítico, realizada desde 1925 por TISELIUS, y especialmente después del empleo e incremento de la electroforesis sobre papel (LEDERER, 1957: cf.), se han multiplicado los trabajos que se sirven de tales dispositivos, con ciertos voltajes y en ambientes estabilizados ("buffers") de cierta fuerza iónica, para separar por carga eléctrica y movilidad las fracciones proteínicas que forman parte de sistemas altamente específicos, como los del suero, hemoglobinas, hemolinfas, etc.

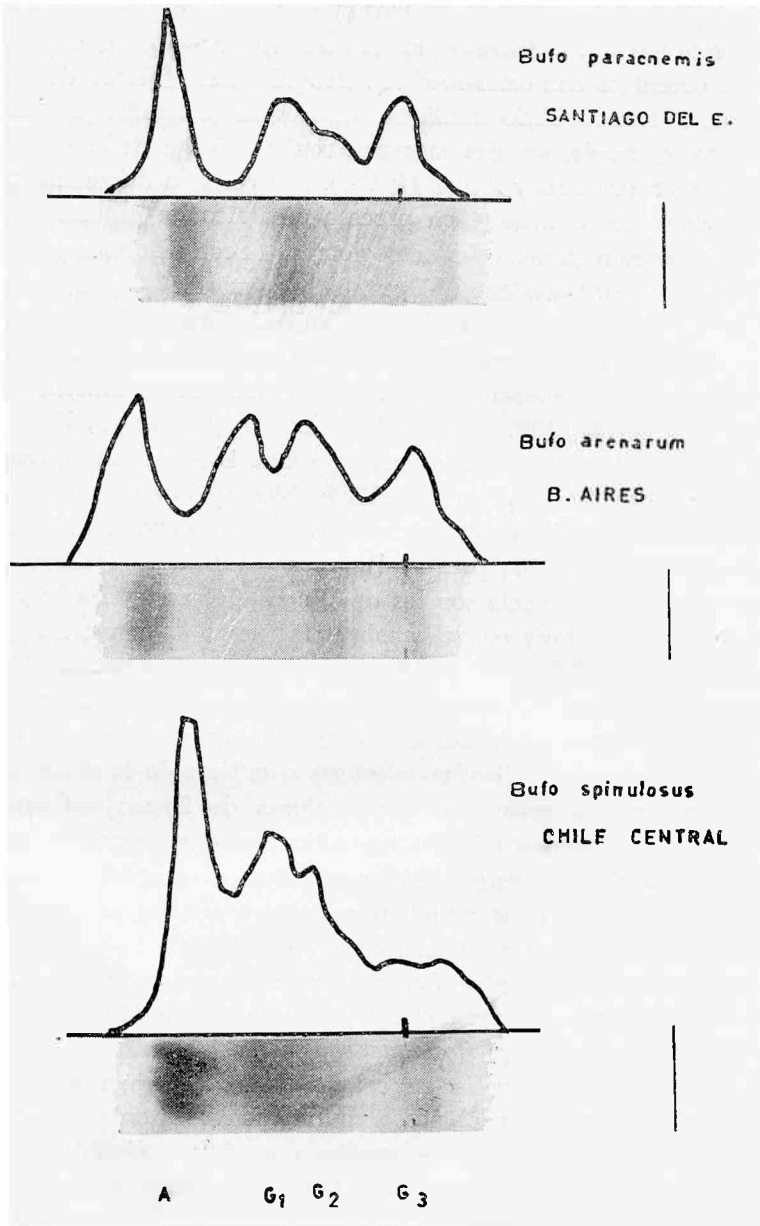


Figura 3

Diferencias electroforéticas en las seroproteínas de algunas especies sudamericanas de *Bufo*: la fracción de mayor movilidad (A) es referible a las albúminas; las otras (G₁, G₂, G₃), a las globulinas. ("Buffer" 8.6, V.650, 6 horas de corrimiento, papel Whatman 3MM.) (Según BERTINI y CEI, 1959.)

Dejamos para otra discusión los límites críticos de evaluación de los resultados obtenidos con estos medios fisicoquímicos. Dentro de sus posibilidades, se han revelado auxiliares valiosos en el estudio comparativo de los sistemas fundamentales macromoleculares, sobre todo en la confrontación de taxones muy afines (fig. 3), a veces sólo diferenciados por factores fisiológicos o todavía en proceso dinámico de especiación. Se han estudiado detenidamente las hemoglobinas (Peces: BUHLER y SHANKS, 1959; Mamíferos y Aves: SAHA, DUTTA y GOOSH, 1957), y las seroproteínas de Mamíferos (DEUTSCH y GOODLOE, 1945; GANZIN, MACHEBOEUF y REBEIROTTE, 1952, etc.), Aves (CLEGG, 1951; COMMON, MCKINLEY y MAN, 1953; WALL y SCHLUMBERGER, 1957), Reptiles (DEUTSCH y McSHAN, 1949; GLEASON y FRIEDBERG, 1953; COHEN, 1954; COHEN y STICKLER, 1958), Anfibios (LANZA y ANTONINI, 1955; BERTINI y CEI, 1959), Peces (DRILHON, 1953) y Elasmobranquios (IRISAWA, 1954; STARR y FOSBERG, 1957). La tentativa de una verdadera clave sistemática electroforética ha sido hecha por DESSAUER y FOX (1956) para los Reptiles y Anfibios. Trabajos generales de notable importancia son los de WOODS, PAULSEN, ENGLE y PERT (1958), por electroforesis en gel, analizando sueros de numerosos Crustáceos, Moluscos y Xifosuros, y los de VAN SANDE y KARCHER (1960), cuyos ferogramas permiten identificar significativas diferencias en las hemolinfas de Triatómidos, Ixódidos y Argásidos, grupos de gran interés parasitológico. Las posibilidades selectivas o críticas de la electroforesis aparecen en fin subrayadas por observaciones de ZWEIG y CRENSHAW (1957), y CEI y BERTINI (1959), respectivamente en seroproteínas de tortugas del género *Pseudemys* y en ranas sudamericanas del género *Leptodactylus*. Los ferogramas permiten en estos casos reconocer especies cuyas diferencias residen en gran mayoría en el ciclo biológico u hormonal (*Leptodactylus ocellatus*, *Leptodactylus chaquensis*) o formas cuya posición taxonómica no supera el rango subespecífico (*Pseudemys floridana floridana*, *Pseudemys floridana suwanniensis*).

También la cromatografía en columna —frecuentemente usada en recientes estudios en hemoglobinas, y unidimensional en papel— puede brindar a los taxónomos nuevas y amplias gamas de posibilidades, como pusieron primeramente en evidencia BUZZATI-TRAVERSO y RECHNITZER (1953), RASMUSSEN (1954) y FOX (1956), en la familia Drosophilidae, tan familiar a los genetistas. La ventaja del método, efectuado con sustancias específicas y frescas, en oportunas condiciones físicas y químicas (cámaras saturadas con líquidos adecuados, secado, revelado con ninhidrina u otros compuestos), consiste en la separación de grupos peptídicos y hasta de los aminoácidos, cuya absorción y corrimiento en las

hojas de papel (ascendente, descendente) da lugar a cromatogramas bien característicos, que si son reproducibles y constantes, representan un "test" de comparación individual y taxonómica de indudable valor. Fox ha alcanzado a revelar, sin embargo, con cromatografía bidimensional en los tejidos de *Drosophila melanogaster*, 21 "manchas" de aminoácidos o grupos de aminoácidos característicos en esta especie; pero también un grupo peptídico más, presente exclusivamente en los cromatogramas del insecto macho, y por ende con significado de **péptido sexual**. Este ejemplo es suficiente para confirmar una vez más el grado de sensibilidad logrado por algunos métodos no morfológicos, y su presente interés para la taxonomía y filogenia.

BIBLIOGRAFÍA

- BALDWIN, E., 1937. *An introduction to comparative biochemistry*. Cambridge Univ. Press, London (3ª ed., 1948).
- BERTINI, F., y J. M. CEI, 1959. "Electroferogramas de proteínas séricas en el género Bufo". Acta I Congr. Sudam. Zool., La Plata, 1959.
- BORDET, J., 1899. Ann. Inst. Pasteur, 9, 462.
- BOYDEN, A. A., 1926. "The precipitin reaction in the study of animal relationships." *Biol. Bull.*, 50, 73-107.
- 1932. "Precipitin tests as a basis for a quantitative phylogeny." Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 29, 955-957.
- 1934. "Precipitins and phylogeny in animals." *Am. Nat.*, 68, 516-536.
- 1942. "Systematic Serology: a critical appreciation." *Physiol. Zool.*, 15, 109-145.
- 1943. "Serology and animal Systematics." *Am. Nat.*, 77, 234-255.
- BOYDEN, A. A., y D. G. GEMEROY, 1950. "The relative position of the Cetacea among the orders of Mammalia as indicated by precipitin tests." *Zoologic.*, 35, 145-151.
- BOYDEN, A. A., y G. K. NOBLE, 1933. "The relationships of some common Amphibia as determined by serological study." *Am. Mus. Novit.*, 606, 1-24.
- BUHLER, D., y W. E. SHANKS, 1959. "Multiple hemoglobins in Fishes." *Science*, 129, 3353, 899-900.
- BUZZATI-TRAVERSO, A. A., y A. B. RECHNITZER, 1953. "Paper Partition Chromatography in Taxonomic Studies." *Science*, 117, 58.
- CAMPBELL, D. H., y G. E. McCASLAND, 1944. "In vitro anaphylactic response to polyhaptenic and monohaptenic simple antigens." *J. Immunol.*, 49, 315.
- CEI, J. M., y F. BERTINI, 1959. "Diferencias entre *Leptodactylus ocellatus* y *Leptodactylus chaquensis* reveladas por vía electroforética en suero." Acta I Congr. Sudam. Zool., La Plata, 1959.
- CLEGG, R. E.; P. E. SANFORD, R. E. HEIM, A. C. ANDREWS, J. S. HUGHES y C. D. MUELLER, 1951. "Electrophoretic Composition of the Serum Proteins of normal and Diethyl-stilbestrol treated Cockerels." *Science*, 114, 437.
- COHEN, E., 1954. "A comparison of the total protein and albumin content of the blood sera of some Reptiles." *Science*, 119, 3081, 98-99.

- COHEN, E., y G. B. STICKLER, 1958. "Absence of albuminlike serum proteins in Turtles." *Science*, 127, 3311, 1392.
- COMMON, R. H.; W. P. MCKINLEY y W. A. MAN, 1953. "Filter paper electrophoresis of avian serum proteins." *Science*, 118, 3055, 86-89.
- CUMLEY, R. W., 1940. "Comparison of serologic and taxonomic relations of *Drosophila* species." *J. N. Y. Entomol. Soc.*, 48, 265.
- CUMLEY, R. W., y M. R. IRWIN, 1952. "An immunogenetic study of species-specific antigens in the serum of species of *Streptopelia*." *Genetics*, 37, 396.
- D'ANCONA, U., 1931. "Ricerche di Sereni per definire mediante l'anafilassi la posizione sistematica dei Gadidi." *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 11, 3, 417-425.
- DE FALCO, R. J., 1942. "A serological study of some avian relationships." *Biol. Bull.*, 83, 205-218.
- 1952. "Serological identification of Mosquito blood meals." *Proc. N. J. Mosquito Extermin. Assoc.*, 1952, 168-169.
- DESSAUER, H. C., y W. FOX, 1956. "Characteristic Electrophoretic Patterns of Plasma proteins of Orders of Amphibia and Reptilia." *Science*, 124, 3214, 225-226.
- DEUTSCH, H. F., y M. B. GOODLOE, 1945. "An electrophoretic survey of various animal plasma." *J. Biol. Chem.*, 161, 1-20.
- DEUTSCH, H. F., y W. H. MCSHAN, 1949. "Biophysical studies of blood plasma proteins, XII; Electrophoretic studies of the blood serum proteins of some lower animals." *J. Biol. Chem.*, 180, 219-234.
- DRILHON, A., 1953. "Étude de quelques diagrammes électrophorétique de plasmas de poissons." *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 237, 1779-1781.
- ERHARDT, A., 1929. *Ergebn. u. Fortschr. d. Zool.*, 7, 279.
- FLORKIN, M., 1944. *L'évolution biochimique*. Paris, Masson & Cie.
- FOX, A. S., 1956. "Application of paper chromatography to taxonomic studies." *Science*, 123, 3187, 143-144.
- GANZIN, M., y M. MACHEBOEUF, 1952. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 26.
- GANZIN, M.; M. MACHEBOEUF y P. RIBEIROTTA, 1952. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 34, 26.
- GAVRILOV, K., 1959. "Nuevas ideas sobre la megaevolución." *Holmbergia*, 6, 14, 49-69.
- GEMEROY, D. G., 1943. "On the relationship of some common fishes as determined by the precipitin reaction." *Zoologic.*, 28, 109-123.
- GLEASON, T. L., y F. FRIEDBERG, 1953. "Filter paper electrophoresis of serum proteins from small animals." *Physiol. Zool.*, 26, 95-100.
- GLENN, W. G., 1956. "Serum Agar Measuring Aid (SAMA)." *School of Aviat. Medic. Report*, 56-83.
- 1957. "Direct Photometry of diffusing precipitin systems for characterizing proteins." *The Serolog. Mus.*, 18, 1-3.
- IRISAWA, H., y A. F. IRISAWA, 1954. "Blood serum protein of the marine Elasmobranchii." *Science*, 120, 849.
- IRWIN, M. R., 1947. "Immunogenetics." *Advanc. in Genetics*, 1, 133.
- KORNBERG, A., 1960. "Biological synthesis of Desoxyribonucleic Acid." *Science*, 131, 3412, 1503-1508.
- KRAUS, R., 1897. "Über spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera, Typhus und Pestbouillon culturen, erzeugt durch homologes Serum." *Wein. Klin. Wochenschr.*, 10, 736-738.

- LANDSTEINER, K., 1947. *The specificity of serological reactions*. Harvard Un. Press.
- LANZA, B., y F. M. ANTONINI, 1955. "Sulla possibilità di distinguere specie tra loro diverse per mezzo del protidogramma del siero; Studio su *Rana esculenta* L. y *R. dalmatina* Bnp." *Monit. Zool. Ital.*, 43, 4, 293-299.
- LEDERER, M., 1957. *An introduction to paper electrophoresis and related methods*. Elsevier Publ. Co.
- LEONE, C. A., 1947. "Systematics serology among certain insect species." *Biol. Bull.*, 93, 64-71.
- 1947. "A serological study of some Orthoptera." *Ann. Entom. Soc. Am.*, 40, 417.
- 1949. "Comparative serology of some brachyuran Crustacea, and studies in hemocyanin correspondence." *Biol. Bull.*, 97, 273-286.
- 1950. "Serological systematics of some panuliran and astacuran Crustacea." *Biol. Bull.*, 98, 122-127.
- 1950. "Serological relationships among common brachyuran Crustacea of Europe." *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 22, 273-282.
- LIBBY, R. L., 1938. "The photoreflectometer, an instrument for the measurement of turbid systems." *J. Immunol.*, 34, 71-73.
- MAINARDI, D., 1957. "L'evoluzione nei Fringillidi. Concordanza fra una mappa sierologica e i dati dell'analisi elettroforetica delle emoglobine." *Rend. Inst. Lomb. Sc. Lett.*, B, 92, 180-186.
- 1958. "Immunology and chromatography in taxonomic studies on Callinaceous Birds." *Nature*, 182, 1388-1389.
- 1958. "La filogenesi nei Fringillidi basata sui rapporti immunologici." *Rend. Inst. Lomb. Sc. Lett.*, B, 92, 336-356.
- 1959. "Un nuovo metodo di immunologia comparata a scopo sistematico basato sulla somministrazione degli antigeni comuni." *Rend. Inst. Lomb. Sc. Lett.*, B, 93, 91-96.
- NUTTALL, G. H. F., y E. M. DINKELSPIEL, 1901. "Experiments upon the new specific test for blood." *Brit. Med. J.*, 1, 1141.
- 1901. "The new biological test for blood in relation to zoological classification." *Proc. Roy. Soc. London*, 69, 150-153.
- NUTTALL, G. H. F., 1904. *Blood immunity and blood relationship*. Cambridge, The Univ. Press.
- ODIN, J., 1952. *Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis; Methods in Medical Researches*, IV. New York, The Year Book Publish. Inc.
- 1955. "L'analyse immunochimique par la méthode des gels. Moyens et techniques d'identification des antigens." *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 89, 531-555.
- RAPOPORT, E. H., 1959. "Problemas acerca del origen de la vida." *Holmbergia*, 6, 14, 3-18.
- RASMUSSEN, I. E., 1954. 1º *An. Meet. of the Ital. Genet. Ass.*, Rome, 27-3-54.
- RECHNITZER, A. B., 1955. "A serological approach to the systematics of the Viviparous Sea-Perches, Family Embiotocidae." *Doct. Thesis, Univ. of Calif., Scripps Inst. of Ocean. and Los Angeles Campus*.
- REICHERT, E. T., y A. P. Brown, 1909. *The crystallography of haemoglobin*. Publ. 116, Carnegie Inst., Washington.
- REIG, O. A., 1958. "Proposiciones para una nueva macrosistemática de los Anuros." *Physis*, 21, 60, 109-118.

- SAHA, A.; R. DUTTA y J. GHOSH, 1957. "Paper electrophoresis of Avian and Mammalian hemoglobina." *Science*, 125, 3245, 447-448.
- SERENI, E., 1928. "L'anafilassi da un punto di vista biologico." *Biol. Rev.*, 3, 93.
- SIMPSON, G. G., 1945. "The principles of classification and a classification of Mammals." *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 85, 1-350.
- STARR, TH., y W. FOSBERG, 1957. "Filter paper electrophoresis of serum protein from Sharks." *Copeia*, 1957, 4, 292-295.
- TSCHISTOVICH, TH., 1899. *Ann. Inst. Pasteur*, 13, 406.
- TYLER, A., 1955. "Ontogeny of immunological properties; Analysis of Development." Saunders Co.
- VAN SANDE, M., y D. KARCHER, 1960. "Species differentiation of Insects by haemolymph electrophoresis." *Science*, 131, 3407.
- WALL, R. L., y SCHLUMBERGER, 1957. "Electrophoresis of plasma proteins in the Parakeet (*Melopsittacus undulatus*)." *Science*, 125, 3255, 993-994.
- WILHELMI, R. W., 1942. "The application of the precipitin technique to theories concerning the origin of vertebrates." *Biol. Bull.*, 82, 179-189.
- 1944. "Serological relationships between the Mollusca and other Invertebrates." *Biol. Bull.*, 87, 86-105.
- WOODS, K. R.; E. PAULSEN, R. L. ENGLE y J. H. PERT, 1958. "Starch gel electrophoresis of some Invertebrate sera." *Science*, 127, 3297, 319-320.
- ZWEIG, G., y J. W. CRENSHAW, 1957. "Differentiation of species by paper electrophoresis of serum proteins of Pseudemys turtles." *Science*, 126, 3282, 1065-1067.