

SEPARADO DE

ACTAS Y TRABAJOS DEL PRIMER CONGRESO
SUDAMERICANO DE ZOOLOGIA
(La Plata 13 - 24 Octubre 1959)
TOMO IV

**DIFERENCIAS ENTRE LEPTODACTYLUS OCELLATUS Y
LEPTODACTYLUS CHAQUENSIS REVELADAS POR VÍA
ELECTROFORÉTICA EN SUERO**

por

J. M. CEI y F. BERTINI

(Instituto de Biología, Mendoza, Arg.)

La posibilidad de aplicar la electroforesis al reconocimiento y comparación sistemática de las distintas fracciones proteínicas del plasma o suero de distintas especies animales ha sido planteada en el pasado por Deutsch y Goodloe (1945), por Moore (1945), por Tyler (1945), Deutsch y Mc Shan (1949), Janssen (1951), Antonini y Piva (1952), Gleason y Friedberg (1953), Irisawa e Irisawa (1954), Zweig y Crensham (1957), Boyden y Paulsen (1957), Cohen y Stickler (1959), y recién en los anfibios por Lanza y Antonini (1945), quienes analizaron diferencias estadísticamente significativas en sueros de *Rana dalmatina* y *Rana esculenta* de Europa.

Se presentan en este trabajo datos comparativos obtenidos por electroforesis en papel, en muestras homogéneas del mismo sexo (machos), del mismo período del año (15 Julio-15 Agosto, 1959), y en las mismas condiciones ambientales; muestras pertenecientes a las dos especies en que parece dividirse en la Argentina el conjunto poblacional de *Leptodactylus ocellatus* (L), anfibio de amplia distribución neotropical. Anteriormente (Cei, 1948, 1949, 1950, 1956) se reconocieron diferencias fisiológicas de mucha importancia (continuidad o discontinuidad del ciclo sexual masculino) entre las poblaciones del área chaqueña y las poblaciones del litoral y centro-sur, que junto con otras diferencias (morfo-fisiológicas) permitieron afirmar la separación de las poblaciones con área de distribución prevalentemente chaqueña en una especie propia (*Leptodactylus chaquensis* CEI). Se consideró posible elevar a esta categoría sistemática dicho grupo de poblaciones

por ser *Leptodactylus chaquensis* simpatriada con *Leptodactylus ocellatus* (L) en una amplia zona marginal de su área de distribución geográfica, a orillas del río Paraguay, del Paraná y en Corrientes hasta el borde oriental de la Laguna Iberá.

Hemos realizado ahora observaciones sobre 10 ejemplares de *Leptodactylus ocellatus* de Córdoba, y sobre 6 ejemplares (más una hembra) de Tucumán, con un promedio de 5 tiras por ejemplar. Se utilizaron sueros frescos, no hemolizados, después de la extracción por punción cardíaca. Para la separación de las fracciones se utilizó un aparato CIENCU, Mendoza (6 horas, 800 V) con buffer Veronal sódico PH 8.6, fuerza iónica 0.06 (Wunderly, Durrum), y papel Wattman 3MM. Se reveló con Azul de Bromofenol 0.2 % en metanol (media hora).

Los porcentajes relativos de las fracciones se calcularon en base a lecturas fotocolorimétricas, siguiendo la técnica de elución.

Los resultados aparecen reunidos en la tabla I. Aparecen constantemente cuatro fracciones que a partir de la de mayor movilidad electroforética se denominaron A, G1, G2, G3, análogamente a lo que se hizo en otros trabajos similares en otras especies de batracios neotropicales. No hay diferencias estadísticamente significativas en nuestras muestras entre las fracciones A y las fracciones G3, pero sí en las fracciones G1 y G2. En *Leptodactylus chaquensis* la fracción G1 es decididamente preponderante sobre G2, correspondiendo la relación entre los términos medios de los valores individuales de dichas fracciones en las muestras, a una ratio de 2.37. En *Leptodactylus ocellatus* la misma ratio baja a 1.52. Es interesante subrayar que los límites o rango de variabilidad de los valores promedio individuales de ambas fracciones (G1 y G2) no llegan nunca a superponerse en las dos especies. Las curvas que presentamos (fig. 1), acompañando a las tiras características, expresan gráficamente las diferencias comprobadas en los electroferogramas de estos *Leptodactylus*.

En espera de seguir con nuestras investigaciones sistemáticas sobre este aspecto de la especificada proteínica en las formas del conjunto de *ocellatus* en un mayor número de poblaciones y de ecotipos, y utilizando como en el presente caso proteínas frescas, se quiso observar si las mismas diferencias estadísticas entre fracciones y la ratio G1/G2 se mantuvieron en proteínas conservadas. Naturalmente haciendo presente de haber tenido en cuenta la desnaturalización de las proteínas conservadas (sueros recolectados en verano, febrero-marzo,

1959, mertiolatados, y mantenidos hasta agosto 1959 en frigidare, a 4°C). A pesar de considerar como informativos estos segundos datos (tabla II), es posible observar que comparando el promedio de los valores correspondientes a las lecturas realizadas en pools de poblaciones de *Leptodactylus ocellatus* (Buenos Aires, San Luis) y de *Leptodactylus chaquensis* (Tucumán, Salta, Jujuy, Chaco), respectivamente, las diferencias estadísticas entre las fracciones A, G1, G2, G3, son exactamente las mismas que las verificadas en las proteínas frescas (datos individuales) de los ejemplares de Julio-Agosto 1959. Análoga tendencia sigue la ratio G1/G2.

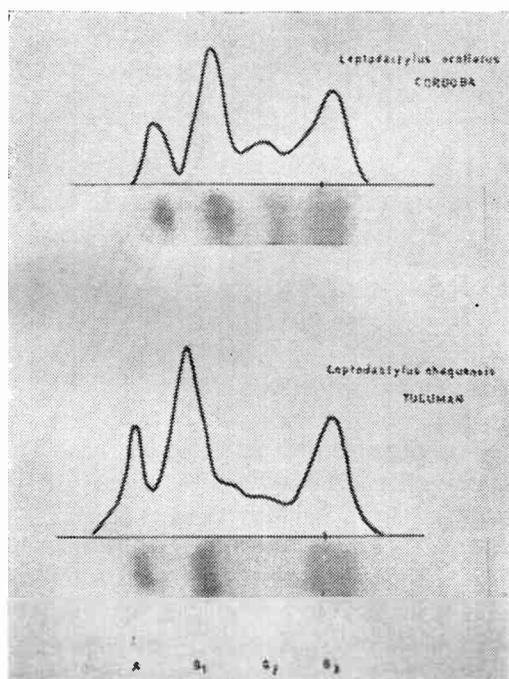


Figura 1

Concluyendo: las diferencias sero-proteínicas aquí comprobadas parecen presentar, por su significado estadístico, un carácter sistemático evidente, y son un elemento más en favor de la separación biológica existente entre las dos especies componentes el conjunto de *ocellatus*, que presumiblemente se encuentra en un proceso de especiación reciente o en curso, porque a pesar de la gran afinidad morfológica y etológica

MUESTRAS INDIVIDUALES — PROTEÍNAS FRESCAS — AGOSTO 1959

Leptodactylus chaquensis - Tucumán.			
n = 6 machos	A 17,74 ± 1,96 (16,40-21,45)	G1 37,35 ± 1,26 (36,45 — 39,50) G1/G2 = 2,37	G2 15,74 ± 1,19 (14,20-17,25)
1 hembra	20,70	36,75	15,75
Leptodactylus ocellatus - Córdoba.			
n = 10 machos	16,21 ± 1,91 (12,23-19,35)	33,20 ± 3,50 (24,60 — 35,75) G1/G2 = 1,52	21,08 ± 1,84 (18,15-23,80)
Diferencias poblacionales en las fracciones proteínicas séricas: t y p según Fisher.			
L. chaquensis/L. ocellatus:	A	G1	G2
t	1,52	3,40	7,02
Tucumán/Córdoba	0,20 — 0,10	0,02 — 0,01	<0,001
Proteínas conservadas de Leptodactylus ocellatus (Promedio general de 12 electroferogramas de pools: de San Luis [6] y Buenos Aires [6]).			
	A	G1	G2
	17,3 ± 1,70	27,7 ± 3,60 G1/G2 = 1,06	25,9 ± 1,60
			29,0 ± 5,20
Proteínas conservadas de Leptodactylus chaquensis (Promedio de 23 electroferogramas de pools: de Tucumán [6], Jujuy [6], Salta [6] y Chaco [5]).			
	17,70 ± 2,90	35,70 ± 6,70 G1/G2 = 1,83	19,50 ± 2,90
Diferencias poblacionales en las fracciones de las proteínas séricas: t y p según Fisher.			
	A	G1	G2
Leptodactylus ocellatus/L. chaquensis:	0,40	4,11	9,13
t	0,70 — 0,60	0,01 — 0,001	<0,001
p			1,21
			0,30 — 0,20

parece probablemente haber llegado hasta el aislamiento reproductivo y genético, según parecería ser el caso de las poblaciones simpátridas en Corrientes.

LITERATURA CITADA

- ANTONINI F. M. & PIVA G.—Boll. Soc. It. Biol. Sper., 28, 12, 1877, 1952.
 BOYDEN A. A. & PAULSEN E. C.—Serol. Mus. Bull., 18, 7, 1957.
 COHEN E. & STICKLER G. B.—Science, 127, 3311, 1392, 1958.
 CEI J. M.—Acta Zool. Lilloana, 6, 283, 1948.
 CEI J. M.—Acta Zool. Lilloana, 7, 113, 1949.
 CEI J. M.—Acta Zool. Lilloana, 9, 395, 1950.
 CEI J. M.—Biológica, 22, 45, 1956.
 DEUTSCH H. F. & GODLGE M. B.—J. Biol. Chem., 161, 1, 1945.
 DEUTSCH H. F. & Mc SHAN W. H.—J. Biol. Chem. 180, 219, 1949.
 GLEASON T. L. & FRIEDBERG F.—Physiol. Zool. 26, 95, 1953.
 IRISAWA H. & IRISAWA A. F.—Science, 120, 849, 1949.
 JANNSSEN L. W.—Verhand. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Aftel. Natuurk., II, 47, 3, 1, 1951.
 LANZA B. & ANTONINI F. M.—Monit. Zool. Ital., 43, 4, 293, 1955.
 MOORE D. H.—J. Biol. Chem., 161, 21, 1945.
 TYLER A. & METZ C. B.—J. Exp. Zool., 100, 387, 1945.
 ZWEIF G. & CRENSHAW J. W.—Science, 126, 1065, 1957.

DISCUSIÓN

- L. CAPURRO: ¿Ha hecho algún estudio comparativo de los resultados obtenidos en el género *Bufo* con este resultado tan interesante que nos ha demostrado en el género *Leptodactylus*? Porque eso nos daría un índice del valor que el método tiene respecto de los géneros. Como ha trabajado en los dos, tal vez algunas conclusiones previas podría indicarnos en este momento.
- J. CEI: Contestando la acertada pregunta del Doctor Capurro quiero señalar que el método a nosotros nos parece más sensible cuando estamos en presencia de especiaciones dentro de un género. Puede seguramente tener un significado sistemático de valor porque indudablemente investigadores, especialmente en Estados Unidos y Japón, han estudiado el problema en otros grupos de vertebrados y han observado diferencias sistemáticas que tocan a clases u órdenes de otros vertebrados, en particular reptiles y elasmobranchios. Pero, lógicamente, para poder tener observaciones comparativas intergenéricas, es oportuno reunir un mayor número de datos sobre las especies que constituyen aún, filogenéticamente, lo que nosotros llamamos género.

Desearía además añadir que hay cierta diferencia entre estas dos formas *Leptodactylus ocellatus* y *Leptodactylus chaquensis*. Hay trabajos realizados en la Universidad de Tucumán, por los doctores Barilari y Bidart Prear, que comprobaron que en las mismas condiciones y dosis, el veneno cutáneo de *Leptodactylus ocellatus* mata al cobayo y en la misma situación el del *Leptodactylus chaquensis* no lo hace.

Durante el Congreso de Fisiología de Buenos Aires, celebrado el mes pasado, conversando con el doctor Spanner, que es uno de los descubridores de la serotonina, me decía que estudiando series de extractos de pieles de *Leptodactylus ocellatus*, procedentes del Brasil (Porto Alegre y otras partes), sabía que había trabajado con *Leptodactylus chaquensis* y eso, es lógico, porque son esferas de investigación distintas. No me explico, decía, por qué el material humano es perfecto técnicamente y, sin embargo, no se encuentra la amina fenólica que yo llamo leptodactilina.