COLECCION HERPETOLOGICA
Y BIBLIOTECA
Dr. José Miguel Cei

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FUNDACION E INSTITUTO MIGUEL LILLO

BIBLIOTECA
JORGE D. WILLIAMS

ACTA ZOOLOGICA LILLOANA

TOMO XXIV

J. M. CEI - NIVELES ACTUALES DE APROXIMACION DE LA SISTEMATICA NO MORFOLOGICA

(págs. 293 - 308)

TUCUMAN

REPUBLICA ARGENTINA

1969

BIBLIOTECA
JORGE D. WILLIAMS

NIVELES ACTUALES DE APROXIMACION DE LA SISTEMATICA NO MORFOLOGICA (*)

Por José M. Cei

SUMMARY

Actual approximation levels in non morphologic systematics. — The author recalls that non morphological systematics already began at the dawn of the century with Nuttall's discoveries in the field of serology. From then on, biochemistry provided a wide array of fields and methods which made a major part of the New Systematics. However, the New Systematics is not "antimorphological" but merely "anti-typological".

The electrophoresis is one of the most useful techniques. Methods have been devised for different taxonomic levels. Some proved class characters and others revealed population specificities. As a by-product, some interesting ecological correlations has been also discovered: high rates of albumine in terrestrial animals for instance.

Chromatography also yielded very important results, for instance in the comparative study of the skin poisons of the Amphibians. Finally, the author cites the precipitine tests as used by Boyden and his collaborators. Amongst the most striking results in this line of investigation, are the suggestion that *Phyllomedusa* is actually more closely related to *Bufo* than to *Hyla*, the confirmation of a Ceratophryid "cluster" with the additional hint that *Odontophrynus* does not belong to it. Here again, the method can be accurate enough to detect inter-populational differences.

Lo que se acostumbra llamar sistemática no morfológica, no es en realidad un aspecto del todo novedoso de las Ciencias Zoológicas de las últimas décadas... Hace más de sesenta años Nuttal (1904 encaraba con gran claridad el problema de las relaciones serológicas interespecíficas determinadas por antígenos comunes, y luego, después de los trabajos de Reichet y Brown sobre los cristales específicos de hemoglobinas (1909), de Sereni sobre anafilaxia en peces (1928), de Landsteiner, Uhlenhuth y muchos otros (que investigaron

* Leído en la Mesa Redonda sobre Caracteres no Morfológicos en Sistemática.

las propiedades inmunológicas de las proteínas o sus características biológicas y bioquímicas) multiplicaron los ejemplos de problemas de afinidades taxonómicas abordados por vías diferentes de las descriptas, propias de la sistemática clásica. Pronto aparecieron síntesis generales como la de Baldwin en 1937 o de Florkin en 1944. El impulso mayor hacia el estudio comparativo y la sistematización de los caracteres "invisibles" lo dieron, desde 1940, el continuo perfeccionamiento de las técnicas de laboratorio; la electroforesis en sus variados tipos; la cromatografía; la photronreflectometría aplicada por Libby y sobre todo por Boyden a los tests de precipitinas; las inmunotécnicas de Oudin y de Ouchterlony; la endocrinología; la histoquímica; las técnicas citogenéticas, y desde 1955 en adelante, los conocimientos estructurales revolucionarios de los factores genéticos nucleotídicos, fundamentales para la codificación· información y síntesis proteínica, así como estamos ahora acostumbrados rutinariamente a considerarlas, gracias a los descubrimientos geniales de Watson, Crick, Nirenberg, Ochoa y muchos otros... La multiplicación de los datos, sus detalles y la sensación, quizás algo eufórica, de encontrarse en posesión de la "llave" del mecanismo químico de la herencia, y por ende de la selección y evolución de las especies, han llevado rápidamente a la expansión de estos nuevos horizontes de lo que se ha denominado —a veces con intención algo crítica— Nueva Sistemática, en contraposición de una Vieja Sistemática, que forzosamente, en su lento pero tan merecedor camino· había tenido que guiarse por lo que se define actualmente, también con alguna intención polémica, "criterio tipológico"...

Sin embargo nos agrada hacer propias las palabras de un herpetólogo americano, Thomas Uzzell, quien, comentando una de las contribuciones modernas más importantes en ese campo, (la International Conference on Taxonomic Biochemistry, Physiology and Serology, en 1962, en Lawrence, Kansas), subrayaba que biológicamente, no hay "...más mérito en el recuento de manchas cromatográficas que en el recuento de escamas o anillos...". Un enfrentamiento jerárquico de la sistemática química y funcional, y de la sistemática morfológica debe en efecto desecharse como científicamente infecundo y dialécticamente impropio, y cualquier tentativa en ese sentido podría tan sólo concebirse en relación con una elemental ignorancia recíproca, como en aquel viejo cuento de ese caballero del siglo XVII quien se batió hasta el fin para asentar la superioridad del poeta Tasso sobre el Ariosto, y herido de muerte confesó no haber nunca leído, ni el Tasso ni el Ariosto...

Sin duda la tipología llevada a sus extremos ya representa ahora una deformación anacronística del criterio taxonómico, y arriesga reducir la especie a una entidad subjetiva, aun partiendo de premisas rígidamente objetivas como los caracteres somáticos. La especie es una entidad espacio-temporal tan fluída como las fuerzas mismas de la vida. Débese estudiar y reconocer en

todos sus matices —verdadera sección de una estructura cuadrimensional— identificándose los valores poblacionales más significativos y frecuentes en términos de adaptación y equilibrio génico. El tipo mantiene sin duda un valor pragmático indiscutible, punto de referencia descriptiva, cuya convencionalidad merece el respeto evidente de todos los elementos prácticos de orientación. A pesar de ser la especie un sistema biológico, su definición nomenclatural necesariamente se impone, cumpliendo el tipo y sus reglamentaciones oportunas· con este requisito mínimo ineludible. Pretender reducir la especie a un tipo puro representaría por otra parte, una abstracción forzosa tanto como postiza. Una serie exclusiva de caracteres fenotípicos no puede identificar fácilmente conjuntos démicos dinámicos, con sus morfosis, y sus fenómenos genéticos complejos de aislamiento e intergradación. En este sentido la buena. la verdadera sistemática morfológica, fundada sobre criterios acertados, estadísticos y comparativos, hace justicia de la tipología demasiado ortodoxa, tanto como la sistemática no morfológica... Los riesgos de la tipología "old type"· de "l'espèce pour l'espèce...", hacen recordar irónicamente el humorismo de la breve historia de H. G. Wells, "Los triunfos de un taxidermista", donde se habla de un animal fantástico· delicia de los tipólogos, reconstruído por un burlón astuto con patas, pico y plumas de los más variados seres del mismo grupo...

Luego de subrayar nuestra preocupación en aclarar que la investigación taxonómica, no morfológica, lógicamente no puede apartarse de los cánones tradicionales, ni de la morfología, de la cual representa el complemento indivisible y recíproco, corresponde ahora detenernos sobre algunos aspectos de los estudios realizados en el país sobre caracteres diagnósticos diferentes de los exosomáticos. Varias son las líneas de trabajo dictadas por la orientación preferida: si citogenética, en base a la reconstrucción de las modificaciones evolutivas del cariotipo; si bioquímica o fisiológica, comparando substancias características comunes en especies y grupos, resultado de actividades celulares y vías metabólicas análogas; si inmunológica, mediante la apreciación, con técnicas diversas, de las componentes antigénicas comunes. Todas convergen hacia una misma finalidad· que es la de captar indirectamente la cantidad de "información" común a los taxa analizados, debida a la afinidad genómica. Pero, sólo en función de los enfoques elegidos se puede aproximar o no a ciertos límites de definición taxonómica, a ciertos niveles de aproximación para la solución de los problemas sistemáticos perseguidos. En una palabra, la aplicación de un método no morfológico, no pretende ni puede profundizar más allá de las fronteras permitidas por el rango de especificidad de sus técnicas.

La electroforesis, en papel, en gel de almidón, en gel de poliacrilamida, es un instrumento de investigación que ha gozado y goza de mucha popularidad

por su expresión demostrativa, que partiendo de condiciones físico-químicas standard del sustrato, permite el reconocimiento de similitudes, sobre todo a nivel interpecífico· las que en el caso particular de proteínas, como las séricas o las enzimas, pueden brindar datos indirectos satisfactorios sobre su homología, es decir, en definitiva, sobre secuencias idénticas de los A D N genómicos. Desde 1959 hemos investigado por esta vía proteínas séricas de numerosas formas de Anuros de las regiones neotropicales, en especial *Bufo, Leptodactylus·* Hylidae y Ceratophryidae (Bertini y Cei, 1959; Cei y Bertini, 1959; Bertini y Cei, 1960 Cei, Bertini y Gallopin, 1961; Cei y Bertini· 1962; Bertini, 1962; Cei y Cohen, 1963). Se ha comprobado que una primera aproximación, la de la electroforesis en papel, por ejemplo, por la movilidad, disposición o número de las bandas en el campo, proporciona informaciones útiles sobre relaciones entre especies filogenéticamente más cercanas, como en el caso de los *Bufo* del grupo *marinus* (Bertini y Cei, 1962) o de *Odontophrynus occidentalis, americanus* y *cultripes* (Cei, 1962, Savage y Cei, 1965) y también entre especies de historia evolutiva, o especiación reciente, como en el caso de las formas crípticas *Leptodactylus ocellatus* y *chaquensis* (Cei y Bertini, 1961) o de las interesantes *Pleurodema* del grupo *nebulosa-guayapae,* bien encaradas aún por esta vía por Barrio (1964). Pero la misma aproximación no es suficiente para determinar agrupaciones intragenéricas o claves verdaderas, superiores a las fundadas sobre caracteres morfológicos eficaces. Bertini y Rathe (1960; 1962), al término de un estudio de 24 especies de Anfibios anuros y 3 especies de Reptiles sudamericanos, llegan a conclusiones muy significativas al respecto. Es obvio por sus esquemas que *Pleurodema bibroni* y *Pleurodema nebulosa* son prácticamente irreconocibles, pero asimismo a estas especies y *Leptodactylus bufonius* u *Odontophrynus americanus* y *Ceratophrys ornata,* ni la movilidad relativa podría separar estos escuerzos de un *Bufo fernandezae,* del grupo *granulosus.*

Las revisiones de Dessauer y Fox (1962) han contribuído a aclarar nuestras ideas sobre este asunto. Pues examinando electroforéticamente 39 familias de Anfibios y Reptiles para las proteínas plasmáticas, y 40 familias de las mismas clases para las transferrinas y hemoglobinas, establecieron que algún rasgo común puede efectivamente observarse en niveles taxonómicos más elevados. Serpientes y Saurios, por ejemplo, no siempre se distinguen entre ellos, pero constantemente se reconocen de los otros reptiles y de los anfibios por las hemoglobinas de escasa movilidad, por las transferrinas sumamente rápidas, por falta de fracciones plasmáticas de migración parecida a la de las gammaglobulinas y por la presencia de una fracción de movilidad igual o superior a la de la albúmina humana. Asimismo algunos caracteres muy generales, en la movilidad de las fracciones seroproteínicas, separan Hylidae de los demás Anura, dejan reconocer Cryptobranchydae de los demás Caudata, subrayan la

gran distancia de los Cocodrílidos de las otras ramas reptilianas, etc. Especial énfasis se ha puesto en la inutilidad de técnicas altamente resolutivas, cuando se quiera comparar *taxa* de posición sistemática elevada; y tampoco sería lícito hacer hincapie en aquellos rasgos bioquímicos fundamentales para reconstrucciones o filiaciones filogenéticas seguras. Según Dessauer y Fox quedarían prácticamente desconocidos los valores adaptativos naturales relativos a patrones sistemáticos fundados sobre bandas electroforéticas de naturaleza química y movilidad diferentes. Esto es aceptable hasta cierto punto, porque, por lo menos entre las proteínas séricas la albúmina desempeña un papel ecológico evidente en la regulación osmótica y por ende en los procesos adaptativos hacia la independencia ambiental. La escasez o ausencia de fracciones electroforéticas de movilidad correspondiente a la de la albúmina de mamíferos y aves, en la mayoría de los Peces, Seláceos, Ciclóstomos, Dipnoos (Cohen y Risso, 1964) y Urodelos, y las brillantes observaciones de Frieden y Col. (1960-1961) sobre el aumento progresivo de las albúminas en los Anuros en metamorfosis o las de Ghosh y Purohit (1965) sobre el fuerte contenido de albúminas plasmáticas en la sangre de los Roedores del desierto, aportan datos muy interesantes y apoyan nuestros hallazgos (Cei, Bertini y Gallopín 1961) en Anuros de Argentina y otras regiones de Sudamérica. Siempre encontramos una elevada "ratio" albúmina/globulinas en formas terrestres *(Pleurodema nebulosa, bufonina, tucumana, Phyllomedusa, Bufo, Hyla, Leptodactylus bufonius)* pero una "ratio" muy baja en animales acuáticos *(Calyptocephalella gayi, Leptodactylus pentadactylus, Leptodactylus ocellatus, Telmatobius)*. Son interesantes las grandes diferencias comprobadas entre *Pseudis* del grupo *paradoxa* procedentes de las regiones ecuatoriales de Surinam, siempre acuáticas, y *Pseudis* del mismo grupo procedentes del Chaco boreal, expuestas a períodos de sequía invernal, las que presentan valores más altos en la ratio albúmina/globulinas. Se trata sin embargo de un carácter fisiológico de interés evidente para los taxónomos de ese grupo, uno de los más difíciles de tratar en su faz morfológica.

Dessauer y Fox recomiendan, al contrario, métodos de fuerte poder de resolución, como la electroforesis en gel de almidón o de poliacrilamida, o la inmunoelectroforesis, para investigar especificidades proteínicas a nivel de categorías taxonómicas inferiores y hasta infrapoblacionales. Características adicionales de las proteínas, cuales la capacidad de fijación de hierro por las transferrinas o la actividad enzimática localizada de las isozimas, aumentan sustancialmente el significado de muchas técnicas y contribuyen a la positividad de los resultados. En *Natrix sipedon confluens* de una población circunscrita, los investigadores de Lousiana hallan por ejemplo tres transferrinas, combinadas en tres patrones diferentes, los que evidentemente deberían considerarse manifestaciones de variación individual dictadas por factores genéticos. También en *Bufo valliceps* los mismos autores señalan para las bandas

globulínicas 6-7-8-9 y 10, cuatro grupos, surtidos según ciertos índices poblacionales independientes del sexo, y esta misma comprobación análoga a otros datos de Brown en *Bufo americanus* y *woodhousei* (1964), acaba de realizarse por uno de nuestros colaboradores en muestras poblacionales de *Bufo arenarum* de la región de Mendoza (Cohen de Hunau, 1966). Un gradiente sistemático de propiedades similares de los caracteres invisibles es evidente y podría tratarse como se trata en la buena sistemática morfológica los caracteres exosomáticos. La variación de las proteínas plasmáticas de 7 subespecies de *Natrix sipedon* de cinco estados de Norte América, es mayor que la registrada en una sola población local. Cinco transferrinas se distribuyen allí en cinco combinaciones fenotípicas, pero una cierta transferrina de movilidad escasa es la más frecuente en las poblaciones del Norte.

La conveniencia de técnicas no morfológicas a nivel de especies crípticas, puede ser recabada por el análisis de la variación geográfica de las seroproteínas de *Leptodactylus ocellatus* y *L. chaquensis*, expuesto en nuestros trabajos anteriores (Cei y Bertini, 1961). Ambas especies, que tuve hace casi 20 años la "chance" de ir paulatinamente discriminado aquí en Tucumán a través de la redefinición del antiguo *taxon* linneano *ocellatus*, y en primer momento mediante un carácter fisiológico tan inusual como la actividad estacional del testículo, se diferencian en sus proteínas séricas principalmente por dos fracciones globulínicas, que por electroforesis en papel denominamos G_1 y G_2, y cuya ratio (G1/G2) aparece siempre proporcionalmente más elevada en *chaquensis* (límites 1.33-2.37) que en *ocellatus* (límites 0.61-1.52). Si parece haber imbricación de límites, esto se debe únicamente a las condiciones de alopatria, por cuanto donde *ocellatus* y *chaquensis* viven simpátridas siempre las ratios mencionadas subsisten con valores decididamente separados (1.33 y 0.61 en Paraguay, Primavera; 1.50 y 0.97 en Corrientes). Una variación geográfica entre estas dos fracciones, en aquel estadio técnico de resolución, pareció existir también en *Bufo arenarum*, donde las relaciones G_1/G_2 dieron valores de 0.73, 0.84, 0.87 en Buenos Aires y Tucumán, pero 1.02 en Córdoba y 1.07-1.10 en Mendoza (Bertini y Cei, 1960). No nos olvidaremos de la necesidad de un análisis estadístico de la variación poblacional, expresión fenotípica de una información genética individual diferente para las síntesis proteínicas, como en el caso ya citado de *Bufo valliceps*, confirmado ahora en nuestras poblaciones mendocinas de *arenarum*. Pero ya en aquel primer estadio de resolución que es ofrecido por la simple electroforesis en papel, la variación geográfica acentuaba diferencias, probablemente significativas, entre las poblaciones bonaerenses y tucumanas de *arenarum* y las mendocinas. Estas últimas se distinguen efectivamente por varias otras características morfo-fisiológicas, como la existencia de reflejos hipnóticos, las manchas xánticas de feomelaninas, o las respuestas neurosecretorias hipotalámicas en condiciones particulares de

deshidratación. Taxónomos como Philippi y Gallardo hasta las propusieron en épocas sucesivas (1869 y 1965) como entidades sistemáticas: específicas y subespecíficas, respectivamente.

Estos ejemplos indican que la taxonomía molecular adquiere una precisión par o quizás superior a la de los datos morfológicos, a un nivel de diferenciación que parte de un stock filético común inmediato, para el reconocimiento de procesos especiacionales en curso y de la variación intraespecífica que a ello se relaciona. La subespeciación geográfica, fenómeno a veces tan subjetivamente reconocido, puede ser alcanzada como se ha visto, por su crítica metodológica. Los ejemplos citados de trabajos realizados en el país, atañen principalmente a los Anfibios, pero la masa de datos y contribuciones en otros grupos es imponente. Sería suficiente recordar apenas las excelentes investigaciones de Sibley para las albúminas de huevos de Aves (1960), o las de Manwell y Col. (1963; 1966), quienes se sirvieron a la vez de las hemoglobinas, de las lactato-dehidrogenasas, de las esterasas, etc., en formas animales tan variadas como Gansos y Patos de los géneros *Anser* y *Branta,* los Murciélagos de los géneros *Myotis* y *Pipistrellus,* los Sipunculidos *Golfingia,* las Holoturias *Thyonella,* los Ciclóstomos, etc....

Se suman a los aportes de la electroforesis otras afirmaciones recientes de la sistemática bioquímica en este país, refrendando su autoridad crítica creciente. Barrio (1965) ha analizado detenidamente un curioso fenómeno, visto sólo "en passant" por autores anteriores: la existencia de huesos y suero verdes en algunos anfibios, provocada por biliverdina en estrecha unión con las seroglobulinas, o fijada por estructuras calcificadas. Ahora bien, esta hiperbiliverdinemia o cloricia fisiológica, como la llama Barrio, es propia de las familias Hylidae y Pseudidae, donde es relativamente frecuente, y al parecer también existe en varias especies de *Cochranella* (Centrolenidae). Las implicancias de orden filogenético y taxonómico de estos hallazgos son llamativas. Savage y Carvalho (1953) demostraron la validez del *status* familiar de Pseudidae, pero las afinidades de estos anfibios con Hylidae por su cartílago intercalar son notorias (Burger, 1954) y el carácter cloricia aparece condividido también por Centrolenidae, separado de Hylidae, pero para el cual Goin (1962) reivindica afinidades leptodactilídeas. De confirmarse la absoluta exclusividad de la vía metabólica determinante de la cloricia, para Pseudidae, Hylidae y Centrolenidae, lo que hasta ahora parece cierto, la posesión común de ese notable carácter no morfológico, adquiriría una importancia indudable para la filogenia y posición taxonómica de aquellas familias.

Una larga serie de observaciones personales desarrolladas en los últimos ocho años con el equipo de investigadores farmacólogos encabezados por Erspamer, en Italia, nos ha permitido seguir cromatográfica y biológicamente la distribución cuali-cuantitativa, en *taxa* distintos, de productos metabólicos tegu-

mentarios de los anfibios, como las aminas biógenas y los polipéptidos activos. Aquellas sustancias, de efectos fisiológicos a veces poderosos sobre el músculo liso y por ende sobre el aparato cardio-vascular, derivan de aminoácidos precursores —en el caso de las aminas estudiadas, triptófano, tirosina, histidina— por acción de cadenas enzimáticas —decarboxilasa, dehidrogenasa, metil-transferasas, sulfo-conjugasas— evidentemente de especificidad intrínseca escasa, pero cuyo surtido y combinación específica es reflejo fiel de la posición taxo-genética relativa de las formas comparadas. Luego de un largo "screening" de más de 500 formas, y a pesar de la variación individual a veces muy amplia, consecuencia de la "turnover rate" metabólica que no deja de incidir sobre nuestras apreciaciones estáticas, efectuadas sobre extractos metanólicos o acetónicos de pieles frescas o secas, las conclusiones resultan significativas, y hasta permiten clasificaciones intragenéricas que siempre refrendan las deducciones de la sistemática morfológica, y más aún, las refinan y perfeccionan con nuevos elementos críticos, (Cei y Erspamer, 1965; Erspamer y Falconieri Erspamer, 1965).

Sería aquí imposible extendernos sobre el cuadro general que deriva de nuestros hallazgos. Podría recordar que aminas indólicas, como la 5-HT, ya están presentes, y asimismo polipéptidos activos, en los Anuros más primitivos, los Liopélmidos *(Ascaphus truei);* que 5-HT se halla en la piel de los Aglossa africanos pero no en Pipidae neotropicales, ocurriendo igualmente en los Opisthocoela del Viejo Mundo (Discoglossidae) pero en Rhinophrynidae, existiendo en los Pelobátidos americanos *(Scaphiopus)* pero no en *Pelobates* de Europa y haciendo su aparición aquella amina en algunos Ránidos, pero no en Microhílidos y Pséudidos. Manteniéndose siempre esporádica y deficiente en Hílidos y Atelopódiidos, la 5-HT alcanza pues una extraordinaria expansión, también con varios derivados metilados de gran interés bioquímico, en Bufónidos, Leptodactylidos y Ceratofrídidos, como si los sistemas codónicos de información de sus enzimas hubieran recorrido caminos definidos, en interacción o competencia con otros sistemas genético-metabólicos y evidementemente en base a desconocidos procesos adaptativos durante la diferenciación filético-morfológica. Podría recordar el descubrimiento de un polipéptido de 11 aminoácidos, la fisalemina, característico de todo el género *Physalaemus,* pero no de *Pleurodema,* ni de *Leptodactylus;* o la ausencia, prácticamente de cualquier actividad funcional biológicamente importante en subfamilias enteras de Leptodactylidae, como Telmatobiinae, Calyptocephallinae, Elosiinae, Cyclorhamphinae, Batrachylinae, Eleutherodactylinae, pero no en los aberrantes Rhinodermatinae, que abundan en 5-HT. Podríamos detenernos sobre la excepcional variedad de polipéptidos, algunos de tipo bradiquinínicos, en la piel de todas las Phyllomedusae, diferencia sorpresiva con los demás Hylidae que no los poseen, y carácter bioquímico que subraya la divergencia filética precoz de ambas ramas,

vislumbrada en algunos de nuestros tets serológicos (1963), y válidamente argumentada por Bertha Lutz (1965)... [1]

Un ejemplo algo más detallado puede dar el género *Leptodactylus,* en el cual las secciones propuestas antiguamente por A. Lutz (1930) son también realidad para el metabolismo de las aminas indólicas, fenólicas e imidazólicas. De acuerdo con Lutz hemos reconocido un grupo Cavícola, casi carente de actividad enzimática amino-biogénica en la piel, un grupo Platymantis, donde fenoles (leptodactilina) e indoles (5-HT y Bufotenidina) se surten en proporciones distintas, en ciertos casos casi iguales *(L. caliginosus podicipinus),* y finalmente una sección Pachypus, recién comentada morfológicamente también por Gallardo (1964) cuya evolución ha llegado ya a provocar sub-grupos especializados. Tenemos en efecto *L. bolivianus* y *L. ocellatus-chaquensis,* las dos últimas especies crípticas tantas veces mencionadas, que están dotadas solamente de leptodactilina, el amonium cuaternario de la tirosina, pero *L. laticeps,* y *L. pentadactylus,* sumamente escasos en leptodactilina, se caracterizan por derivados indólicos numerosos y también por derivados imidazólicos, como la histamina y sus formas metiladas y acetiladas. Muy interesante es el proceso de especiación en curso, en las formas alopátridas de *pentadactylus.* Todos poseen trazas de leptodactilina, 5-HT e histamina, pero la piel de *pentadactylus labyrhinthicus* de Misiones puede metilar m-tiramina e histamina pero no 5-HT; la de *pentadactylus pentadactylus* de Amazonia y Venezuela lo hace con la m-tiramina y p-tiramina pero no con la 5-HT, mientras que la piel de *pentadactylus dengleri* de Costa Rica metila igualmente m-tiramina y 5-HT. Mediante esos caracteres metabólicos, las tres formas alopátridas se hacen reconocibles por sus manchas cromatográficas, más netamente aún que por sus caracteres exosomáticos, ofreciendo entonces elementos de juicio valederos para una futura revisión de su status real, (Erspamer, Roseghini and Cei, 1964).

Y terminaremos ahora con una última y breve mención de algunos de nuestros trabajos sobre los índices de especificidad de las reacciones de precipitinas, las que —como se dijo al comienzo— desde hace más de sesenta años iniciaron con Nuttall los primeros ensayos significativos de la sistemática no morfológica. Las técnicas en placas de agar de Ouchterlony y la inmunoelectroforesis se han impuesto en muchos laboratorios, pero nos es grato insistir sobre las ventajas de la expresión cuantitativa permitida por el Photronreflectometro de Libby, el que seguimos usando desde hace más de seis años con resultados alentadores en nuestro laboratorio, y que tiene en su activo una serie larga de trabajos, particularmente en su país de origen, Estados Unidos, por mérito de Boyden, Di Falco, Gemeroy· Leone, Paulsen, Bolton, Glenn, etc.

---

(1) Comunic. III Congr. Sudamericano Zool. S .de Chile, oct. 1965.

Casi no hay grupo animal —cabe subrayar— que haya escapado a la lógica comparativa de las curvas selectivas homo-heterólogas proporcionadas por las células fotoeléctricas del Photroner, sensibles al "scattering" de las partículas precipitadas durante la incubación de la mezcla antígeno-antisuero, en diluciones diferentes.

Moluscos, Crustáceos, Peces, Insectos, Aves, Mamíferos, Reptiles, Anfibios, etc., sin hablar de numerosos grupos de Vegetales, fueron sometidos a este medio de análisis con resultados de interés para zoólogos, botánicos o evolucionistas (Cei, 1965). La crítica muy acertada de Alan Boyden (1956) establece tres niveles de aproximación para los estudios serológicos que utilizan precipitinas: el primero, donde sueros anti-mezclas de antígenos (p. e. sueros totales) se miden con las mezclas mismas; el segundo, donde antisueros preparados contra un solo antígeno se hacen reaccionar con el suero total del cual es originario el antígeno; el tercero, en fin, de difícil realización práctica para los equipos de muchos laboratorios, en el cual intervendrían directamente sistemas aislados antígeno-anticuerpos, estos últimos también preparados exclusivamente para un solo antígeno. Diré en seguida, que todo lo que hasta ahora hicimos pertenece al primer nivel de Boyden, en particular a lo que él llama sistema bi-dimensional, donde normalmente la cantidad de anticuerpos queda constante en la reacción, pero varía la dilución del antígeno, en nuestro caso suero total de especies diferentes, con el cual se inmunizaron conejos, reforzando el proceso con coadjuvantes.

Los resultados obtenidos en Anfibios, neotropicales y neárticos, Mamíferos como *Xenarthra* (Roig 1964), y hasta en ciertas plantas (*Prosopis;* Cohen, Cei y Roig, en prensa) atañen a la historia pretérita de grupos de especies, de géneros y hasta de familias, pero también nos han permitido, sorpresivamente, discriminar especies crípticas, o comparar conjuntos poblacionales. Los tests cruzados de precipitinas quizás pueden relacionarse con diferencias cuali-cuantitativas electroforéticas entre especies, cercanas o lejanas. Esto parece demostrarse para el género *Leptodactylus* (Gallopin, 1962; Cei y Bertini, 1961; Cei y Cohen, 1965; Cohen, Cei y Castro, 1966) o *Bufo* (Cohen, 1964; Cei y Cohen, 1965) mientras Boyden insiste sobre el carácter más conservativo de las albúminas en comparación de las otras fracciones seroproteínicas. Las tendencias de las curvas homo-heterólogas de nuestros tests están de acuerdo con este principio general evolutivo.

Cuando se exploran relaciones entre *taxa* de jerarquía elevada (Cei, 1963), las conclusiones plantean problemas algo más inciertos pero a menudo muy sugestivos. Por ejemplo, *Rana palmipes,* que posee un 51 % de área homo-heteróloga común con *Rana pipiens,* se coloca a una gran distancia, relativamente equivalente, de Leptodactílidos, Hílidos y Bufónidos (18,8 % - 15 % - 15.7 %). *Phyllomedusa sauvagi* revela un 54 % de área homo-heteróloga con

antígeno de *Bufo spinulosus* y curiosamente sólo 39.9 % con *Hyla faber;* 40.3 % con *Leptodactylus ocellatus* y 35 % con *Rana palmipes,* indicando así, su probable precocidad filética frente a los demás Hílidos. Aquellos datos se reproducen prácticamente en *tests* recíprocos, utilizando suero anti-*spinulosus* y anti-*ocellatus.*

anti-*Bufo spinulosus* x *Phyllomedusa sauvagi*	49.5 %
Pleurodema cinerea	40.2 %
Leptodactylus ocellatus	31.2 %
Rana palmipes	19.5 %
anti-*Leptodactylus ocellatus* x *Phyllomedusa sauvagi*	33.4 %
Bufo spinulosus	36.8 %
Rana palmipes	19.9 %

Una serie de tests entre varios géneros de la familia Ceratophryidae (Cei, 1965) permitió comprobar lo acertado de la tesis de Reig (1960), demostrando la distancia indiscutible de todo aquel grupo desde *Calyptocephalella,* y asimismo una afinidad mayor entre *Ceratophrys (C. ornata)* y *Lepidobatrachus* (*L. salinicola*: 57 % de área homoheteróloga). Subrayó al contrario que *Odontophrynus* (*O. americanus* de Argentina, *O. cultripes* de Brasil) se separaba a la vez de *Ceratophrys* y de *Lepidobatrachus.* En base a nuestro metro inmunológico *Odontophrynus* ofrece reacciones con *Lepidobatrachus* y *Ceratophrys,* de la misma envergadura que las ofrecidas por *Leptodactylus* o *Pleurodema,* haciendo pues hasta dudar de la oportunidad de una inclusión entre los Ceratofrídidos de ese grupo de pequeños y tranquilos escuerzos, criterio que según nos consta empieza ya a ser condividido por algunos herpetólogos. Interesante, ya a nivel interespecífico, resultó aquí un test entre un suero anti-*americanus* y antígeno de *O. americanus* y *O. occidentalis* de la población de Neuquén y Sierra de San Luis, respectivamente. Fue evidente la escasa o nula diferencia en ambas reacciones heterólogas de *occidentalis* frente a *americanus,* lo que ya pone énfasis sobre la sensibilidad excepcional de los registros turbidimétricos del Photroner de Libby.

Esta se destaca más aun en otro trabajo (Cei y Cohen, 1965) recientemente publicado (Cohen, Cei, Castro, 1966), dedicado a las especies a menudo mencionadas del grupo *pachypus* de *Leptodactylus.* Suero anti-*ocellatus* de San Luis da reacciones idénticas o casi a la homóloga con antígeno *ocellatus*-Mendoza, ligeramente más débiles con antígenos *ocellatus*-Montevideo o Bahía Blanca (todas entre 100 % y 86.41 %), pero, si de un nivel infraespecífico nos elevamos a un nivel de especies crípticas, con mecanismos de aislamiento

en condiciones alo-simpátricas (Barrio, 1966), ya las áreas heterólogas integradas pasan a valores decididamente inferiores (p. e. anti-*ocellatus* con *chaquensis*-Tucumán 66.4 % con *chaquensis*-Resistencia 52.1 %). En los tests recíprocos el proceso se repite (anti-*chaquensis*-Tucumán con *chaquensis*-Resistencia 97.3 %; con *ocellatus*-San Luis 71.6 %, con *ocellatus*-Mendoza 79.3 %, con *ocellatus*-Bahía Blanca 83.1 %) y en las inmunoreacciones entre *L. pentadactylus* y *ocellatus* o *chaquensis*, impresiona una distancia aún mayor de la especie misionera frente a las otras (rango de porcentajes recíprocos entre *L. pentadactylus* y *ocellatus*, 48 % y 62.4 %; entre *L. pentadactylus* y *chaquensis*, 48.3 % y 60.9 %; contra 66.4 % y 83 %, rango de porcentajes entre *ocellatus* y *chaquensis*).

No sería posible extendernos más en este análisis, considerando que los ejemplos dados y su crítica son suficientes para dejar bien sentado, desde luego, que no existe más que una sistemática, la verdadera y objetiva sistemática, la que desde Aldrovandi a Dessauer, desde Buffon a Nuttall, o desde Cuvier a Mayr, ha seguido el camino ininterrumpido —a veces inevitablemente incierto o tortuoso— propio de todas las Ciencias Naturales.

BIBLIOGRAFIA

BAKER, C. M. A. y HANSON, H. C. 1966. Molecular genetics of avian proteins –VI– Evolutionary implications of blood proteins of eleven species of Geese. — Comp. Biochem. Physiol. *17* : 997-1006.

BALDWIN, B. A. 1937 An Introduction to Comparative Biochemistry. Cambridge Univ. Press 1-ix: 1-164.

BARRIO, A. 1964. Especies crípticas del género *Pleurodema* que conviven en una misma área, identificadas por el canto nupcial (Anura, Leptodactylidae). — Physis, *24* : 471-489.

BARRIO, A. 1965. Cloricia fisiológica en Batracios Anuros. — Physis. *25* : 137-142.

BARRIO, A. 1966. Divergencia acústica entre el canto nupcial de *Leptodactylus ocellatus* (Linné) y *L. chaquensis* Cei (Anura-Leptodactylidae). — Physis, *26* :275-277.

BERTINI, F. 1962. El estudio electroforético de las seroproteínas en un problema de diferenciación de subespecies argentinas de *Bufo granulosus*. — Arch. Farm. Bioquím. Tucumán, *10* : 15-48.

BERTINI, F. y CEI, J. M. 1959. Electroferogramas de proteínas séricas en el género *Bufo*. — Acta Primer Congr. Sudamer. Zool. La Plata: 161-167.

BERTINI, F. y CEI, J. M. 1960. Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de *Bufo arenarum*. — Rev. argent. Biol. *36* : 355-362.

BERTINI, F. y CEI, J. M. 1962. Seroprotein patterns in the *Bufo marinus* complex. — Herpetologica, *17* : 231-238.

BERTINI, F. & RATHE, G. 1960. Comportamiento electroforético de hemoglobinas de anuros sudamericanos. — Res. Com. Ses. Cient. Biología Mendoza *10* : 5-8.

Bertini, F. and Rathie, G. 1962. Electrophoretic Analysis of the Hemoglobin of Various Species of Anurans. — Copeia, Nº 1. (April 11): 181-185.

Boyden, A. 1956. On measuring Serological Correspondence among Antigens. — The Serological Museum. Bull. *16 :* 3-8.

Brown, L. E. 1964. An Electrophoretic Study of Variation In the Blood Proteins of the Toads, *Bufo americanus* and *Bufo woodhousei*. — Syst. Zool. *13 :* 92-95.

Burger, W. L. 1954. Two family groups of Neotropical Frogs. — Herpetologica, *10 :* 194-196.

Cei, J. M. 1962. Electroforesis en papel de proteínas séricas y su contribución a la interpretación de un conjunto específico controverso: *Odontophrynus*. — Comunic. II Ses. Cient. Soc. Biología, Córdoba 25/27 Octubre 1962.

Cei, J. M. 1963. Some Precipitin Tests and Preliminary Remarks on the Systematic Relationships of Four South American Families of Frogs. — Bull. Serol. Mus. *30 :* 4-6.

Cei, J. M. 1965. The relationships of some Ceratophryd and Leptodactylid Genera, as indicated by precipitin tests. — Herpetológica, *20 :* 217-224.

Cei, J. M. 1965. Ricenti ricerche e interesse sistematico delle precipitine. — Scientia, *59*.

Cei, J. M. y Bertini, F. 1959. Diferencias entre *Leptodactylus ocellatus* y *L. chaquensis* reveladas por vía electroforética en suero. — Acta Primer Congr. Sudamericano Zool. La Plata: 189-193.

Cei, J. M. y Bertini, F. 1961. Seroproteins in allopatric and sympatric populations of *Leptodactylus ocellatus* and *L. chaquensis*. — Copeia *3 :* 336-340.

Cei, J. M. y Bertini, F. 1962. Proteínas séricas de *Bufo spinulosus*: estudio electroforético y variación geográfica. — Arch. Farm. Bioquím. Univ. Tucumán *10 :* 3-14.

Cei, J. M., Bertini, F. y Gallopin, G. C. 1961. La ratio Albúmina/Globulinas y su probable significado ecológico en Anfibios sudamericanos. — Rev. Soc. argent. Biol. *37 :* 215-225.

Cei, J. M. y Cohen, R. 1963. Electrophoreticpatterns and systematic relations in South-American Toads. — Bull. Serol. Mus. *30 :* 6-8.

Cei, J. M. y Cohen, R. 1965. Test photrónicos y filogenia de los Bufónidos americanos. Acta Tercer Congr. Sudamer. Zool., S. de Chile. Oct. 1965; Inv. Zool. Chil. (en prensa).

Cei, J. M. y Erspamer, V. 1965. Relaciones taxonómicas y evolución bioquímica de las aminas biógenas en el género *Leptodactylus*. — Acta Tercer Congr. Sudamer. Zool., Santiago de Chile, Oct. 1965. Inv. Zool. Chil. (en prensa).

Cei, J. M. y Erspamer, V. 1966. Biochemical taxonomy of South American Amphibians by means of skin amines and polypeptides. — Copeia, *1 :* 74-78.

Cohen, R. 1964. Reacciones de precipitinas y relaciones filogenéticas en los grandes Bufónidos neotropicales. — Ciencia e Investigación *20*, 12: 556-561.

Cohen, R. 1966. Variaciones intrapoblacionales de patrones electroforéticos seroproteínicos en Bufo arenarum. — Comunic. 1ra. Jorn. argent. Zool. Tucumán en Acta zool. lilloana *23 :* 233-239.

Cohen de Hunau, R., Cei, J. M. y Castro, M. P. 1966. Relaciones serológicas en *Leptodactylus* del Grupo Pachypus. — Comunic. 1ra. Jorn. argent. Zool. Tucumán en Acta zool. lilloana *23 :* 241-248.

Cohen, R., Cei, J. M. y Roig, V. G. 1966-7. Ensayos preliminares con técnicas de precipitinas por difusión en gel de agar sobre afinidades proteínicas en el género *Prosopis*. — Comunic. Terc. Ses. Cient. Biol. Soc. argent. Biol. Rosario. 12/14 abril 1965; 115. (Rev. Fac. Ciene. Agrarias Univ. Cuyo, *13 :* 29-41.

COHEN, R. y RISSO, F. J. 1964. Observaciones preliminares sobre las proteínas séricas del Dipnoo chaqueño (*Lepidosiren paradoxa*). — Not. Biol. Fac. Cienc. Exact. Fís. y Nat. Univ. Nac. del Nordeste, Corrientes. *4.*

DESSAUER, H. C. y FOX, W. 1962. Electrophoresis in taxonomic studies illustrated by analyses of blood proteins. — Intern. Conf. en Taxonomic Biochemistry, Physiology and Serology. Lawrence Kansas (in Taxonomic Biochemistry and Serology: Ed. Ch. A. Leone. N. York). 1964.

DESSAUER, H. C., FOX, W. y HARTWIG, Q. L. 1962. Comparative study of transferrins of Amphibia and Reptilia using starch-gel electrophoresis and autoradiography. — Comp. Biochem. Physiol. *5 :* 17-29.

ERSPAMER, V. y FALCONIERI ERSPAMER, G. 1965. Amine biogene e polipeptidi attivi nella pelle di Anfibio. — Riv. Biol. *58 :* 247-269.

ERSPAMER, V., ROSEGHINI, M. y CEI, J. M. 1964. Indole–, imidazole–, and phenyl-alkylamines in tho skin of thirteen *Leptodactylus* species. — Biochem. Pharm. *13 :* 1083-1093.

FLORKIN, M. 1944. L'Evolution biochimique, Masson, Paris: 210.

FOX, W. DESSAUER, H. C. y MAUMUS, L. T. 1961. Electrophoretic studies of blood proteins of two species of toads and their natural hybrid. — Comp. Biochem. Physiol. *3 :* 52-63.

FRIEDEN, E. 1961. Biochemical adaptation and anuran metamorphosis. — Amer. Zool. *1 :* 115-149.

GALLARDO, J. M. 1964. Consideraciones sobre *Leptodactylus ocellatus* (L.) (Amphibia, Anural y especies aliadas). — Physis *24 :* 373-384..

GALLARDO, J. M. 1965. Especiación en tres *Bufo* neotropicales. — Pap. Dep. Zool. Sec. Agric. S. Paulo. *17 :* 57-75.

GALLOPIN, G. C. 1962. El grupo Pachypus del género *Leptodactylus* considerado a la luz de las características electroforéticas de sus seroproteínas. — Physis *23 :* 163-167.

GHOSH, P. K. y PUROHIT, K. E. 1965. A preliminary study of the plasma proteins of some desert mammals. — Mammalia *19 :* 29-34.

GOIN, J. C. y GOIN, O. B. 1962. Introduction to Herpetology. Freeman and Co., i-vii: 1-341.

HERNER, A. E. y FRIEDEN, E. 1960. Biochemistry of Anuran Metamorphosis: VII - Changes in serum proteins during spontaneous and induced metamorphosis. — J. Biol. Chem. *235 :* 2845-2851.

LUTZ, A. 1930. Segunda memoria sobre especies brasileiras do genero *Leptodactylus* incluindo outras aliadas. — Mem. Inst. Osw. Cruz *23 :* 1-20.

MANWELL, C. 1963. The blood proteins of Cyclostomes. A study in phylogenetic and ontogenetic Biochemistry. The Biology of Myxine. Universitetforsl. Oslo 602: 372-455.

MANWELL, C. y BAKER, C. M. A. 1963. A sibling species of Sea Cucumer discovered by starch gel electrophoresis. — Comp. Bioch. Physiol. *10 :* 39-53.

MANWELL, C. y KERST, K. V. 1966. Possibilities of biochemical taxonomy of Bats using hemoglobin, lactate dehydrogenase, esterase and other proteins. — Comp. Bioch. Physiol. *17 :* 741-754.

NUTTALL, G. H. 1904. Blood immunity and blood relationship. Cambridge Univ. Press.

PHILIPPI, R. A. 1869. Ueber einige Tiere aus Mendoza. — Arch. Naturgesch. *35 :* 38-51.

REICHET, E. T. y BROWN, A. P. 1909. The crystalography of haemoglobin. Publ. *116*-Carnegie Inst. Washington.

REIG, O. 1960. Las relaciones genéricas del Anuro chileno *Calyptocephallela gayi* (Dum. et Bibr.). — Actas y Trabajos Primer Congr. Sudamericano de Zoología, La Plata. *4 :* 113-131.

Roig, V. G. 1964. Inmunotest y relaciones sistemáticas en Dasipodidos argentinos. — Ciencia e Invest. Junio: 270-275.

Savage, J. M. y L. De Carvalho, A. 1953. The family position of Neotropical frogs currently referred to the genus *Pseudis*. — Zoológica *38* : 193-200.

Savage, J. M. y Cei, J. M. 1965. A review of the leptodactylid frog genus *Odontophrynus*. — Herpetologica, *21* : 178-195.

Sereni, E. 1928. L'anafilassi da un punto di vista biologico. — Biol. Rev. *3* : 93.

Sibley, C. G. 1960. The electrophoretic patterns of avian egg-white proteins as taxonomic characters. — Ibis *103* : 215-284.

Uzzell, T. M. 1966. (Taxonomic Biochemistry and Serology: Ed. Ch. A. Leone, N. York. 1964). — Copeia, *1*, Reviews and Comments: 143-144.

Instituto de Biología,
Universidad Nacional de Cuyo,
Mendoza (R. A.)