

---

LUIS F. CAPURRO SOTO

Profesor de la Universidad de Chile

## Filogenia experimental

Desde que el hombre abrió los ojos a la observación del mundo de los seres vivientes se sintió impresionado por la enorme variedad de formas en que se expresa el fenómeno vital; esto lo llevó a buscar la manera de ordenarlas, vale decir, de clasificarlas. Pero decir hoy en día clasificación o taxonomía no significa sólo ordenamiento sino que se pretende establecer también los lazos filogenéticos, o sea, las relaciones de parentesco que existen entre las diversas especies animales y vegetales que pueblan la tierra.

Lo que llamamos características específicas y raciales no son más que traducciones de las potencialidades del protoplasma de cada ser viviente y este protoplasma deriva de esa minúscula masa inicial de materia viviente que es el huevo o cigoto formado a su vez por la fusión de dos gametos de distinto sexo, los que, en esta forma, constituyen el puente físico que une una generación a la otra.

El protoplasma o materia viviente puede ser caracterizado, a base de los datos que los estudios experimentales nos han proporcionado, por el alto grado de orden, de organización que posee, orden que se manifiesta a diversos niveles de organización: el nivel atómico-molecular que se nos ha revelado como consecuencia de la aplicación de métodos químicos y bioquímicos; el nivel macromolecular que se nos ha hecho accesible a través de la aplicación de métodos ultraestructurales, el nivel de las estructuras mi-

croscópicas, fruto de la utilización del microscopio óptico para llegar, por último, al concepto de organismo que implica la disposición sistemática de partes, cada una de las cuales desempeña una o varias funciones necesarias para la vida del conjunto.

Este alto grado de organización y la gran complejidad que él implica lleva a una consecuencia: la individualidad biológica.

Son tantas y tan diversas las partes que pueden ordenarse, que pueden hacerlo en miles y miles de formas diferentes; resulta así que cada ser vivo es una combinación de estructuras específicas. Pero estas estructuras no son estáticas, hay un cambio continuo de las moléculas que las constituyen, en consecuencia, el orden que existe en la materia viviente es un orden profundamente dinámico: la organización persiste, pero a base de un cambio ininterrumpido de los materiales que forman su substrato químico.

Dentro del sinnúmero de tipos moleculares que constituyen la materia viviente hay dos que le imprimen su sello específico a cada tipo de protoplasma: las proteínas y los ácidos nucleicos.

Las proteínas constituyen el principal material de que está hecha la vida y los ácidos nucleicos representan los planos de construcción.

Las proteínas son moléculas gigantes formadas por cadenas polipeptídicas de construcción acabadísima y específica, cada tipo de proteína posee un número y una secuen-

cia única de grupos laterales que determinan su tamaño particular y su identidad química.

Además, parece ser que la larga molécula está plegada en una configuración única la que al parecer es un factor importante en la mantención de su actividad biológica.

Puede decirse, en verdad, que cada proteína posee una combinación única de grupos laterales, plegadura, tamaño y forma, mediante la cual se adapta a sus funciones específicas.

Los ácidos nucleicos, planos de organización del protoplasma, mantienen, por un lado, la clave de la constitución hereditaria de todos los seres vivientes y por otro dirigen la síntesis proteica.

Son también macromoléculas formadas por largas cadenas de unidades llamadas nucleótidos en cuya composición interviene una molécula de  $H_3PO_4$  y una molécula de una pentosa (ribosa o su derivado, desoxirribosa), esta última está unida a un pequeño grupo lateral —una base púrica o pirimidica—. Estas bases no siguen un orden regular a lo largo de la cadena polinucleótida y hay cierta evidencia para creer que la secuencia tiene en cada caso un significado particular y determina el significado funcional de la molécula.

Existen dos tipos de ácidos nucleicos: ácidos desoxirribonucleicos (A.D.N.) y ribonucleicos (A.R.N.). Los estudios realizados en ambos tipos, mediante degradación enzimática, sugieren la existencia de un enorme número de ácidos nucleicos estructuralmente diferentes, que se diferenciarían según el grado de polimerización, según el número del C de la pentosa (2-3-5) unido al  $H_3PO_4$ , según el contenido en bases púricas y piridínicas, etc.

Hay ya fundada evidencia que el A.D.N. es una doble molécula formada por dos cadenas enrolladas entre sí en forma helicoidal en tal forma que las bases de una cadena ajustan con las de la otra apareándose la guanina sólo con la citosina y la adenina sólo con la timina. De esta manera la secuen-

cia de las bases en una cadena determina la secuencia en la otra.

Se supone que el A.R.N. está también formado por dos cadenas a pesar de que la difracción con rayos X muestra una estructura irregular. Sin embargo, es posible que esta irregularidad sea el resultado de las técnicas de extracción y que el A.R.N. posea una configuración ordenada en las células cuando está combinado con A.D.N. o con proteínas.

Se ha demostrado que la cantidad de A.D.N. por célula es constante para las células somáticas diploides de todos los individuos de una determinada especie, que los gametos haploides sólo poseen la mitad de esa cantidad y que, en los casos de poliploidismo, la cantidad aumenta cuantitativamente con el aumento del número de juegos cromosómicos presentes.

Esta constancia específica en el contenido en A.D.N. es un argumento de importancia en pro de la idea que él constituye el substrato de las características hereditarias, el material de que están hechos los genes.

Además, se ha podido determinar que el contenido en A.D.N. varía, por lo general, levemente entre las diversas especies de una misma clase, existiendo en cambio diferencias notables entre clases diferentes. En las esponjas y los cnidarios que son los grupos de metazoos más primitivos se encuentran los valores más inferiores entre los invertebrados. Es también interesante el hecho de que estudios comparativos realizados en diversas especies representantes de los Peces Dipnoos, Anfibios, Reptiles y Aves muestran que el contenido en A.D.N. va paulatinamente disminuyendo, lo que estaría sugiriendo cierta relación entre el contenido en A.D.N. y la evolución de los Vertebrados.

Hoy día se dispone de nuevos argumentos para afirmar que el A.D.N. es el material genético o, por lo menos, una importante parte de él.

1.—El A.D.N. está siempre asociado con los cromosomas y no existe en ninguna otra estructura celular.

2.—Avery, MacLeod y McCarty, demostraron que A.D.N. puro extraído de algunas bacterias es capaz de traspasar algunas características de su cepa a una cepa pariente, siendo capaces las bacterias transformadas de transmitir estas propiedades a sus descendientes —transformación de un tipo de neumococo acapsulado y avirulento en otro tipo capsulado y virulento.

3.—Cuando un bacteriófago ataca a una bacteria (acción del fago T sobre *Escherichia coli*) es el A.D.N. del virus y no su proteína, el que entra en la célula bacteriana, obligando al protoplasma bacteriano a sintetizar A.D.N. y proteínas fágicas, macromoléculas específicas diferentes a cualquiera de las que componen la célula huésped infectada. Parece ser, en consecuencia, que el A.D.N. de un fago infectante es capaz de controlar el metabolismo del A.D.N. y de las proteínas de la célula huésped como si fuera una entidad genética que dominase a los genes del huésped.

4.—Al irradiar con luz ultravioleta células intactas de hongos y cereales se encontró que la longitud de onda más efectiva para inducir mutaciones génicas era la misma que aquella bajo la cual se obtiene el máximo de absorción por el A.D.N.

5.—Se ha demostrado que los ácidos nucleicos, en general, son muy sensibles a ciertos agentes mutagenéticos experimentales como son los gases mostazas de N y S.

Si en base a todos estos hechos aceptamos que el A.D.N. representa el material genético cabría preguntarse cómo actúa para determinar las características de un organismo viviente.

Se acepta que los ácidos nucleicos controlan la síntesis de las proteínas que, como hemos visto, son los materiales de construcción de la materia viviente. El A.D.N. llevaría en sí los planos, los patrones de construcción transportándolos de una generación a otra, para lo cual el A.D.N. que constituye a cada gene se autoduplica en la antefase de cada mitosis y de cada meiosis que

ocurren en el curso del proceso gametogénico.

El modelo de Watson-Crick que, como ya hemos visto, supone una estructura en doble hélice para el A.D.N. permitiría explicar la duplicación de la macromolécula suponiendo su separación en las dos cadenas, en forma tal que, cada una de ellas, se comportaría como un molde para formar la cadena complementaria.

El A.R.N. constituiría las copias usadas en la síntesis actual de proteínas, la secuencia de las bases en cada macromolécula de ácido ribonucleico determinaría el orden en que se combinarían las moléculas de aminoácidos para constituir las cadenas polipeptídicas.

La mayor parte del A.R.N. se encuentra combinado con proteínas (complejos fosforribonucleoproteicos) constituyendo partículas citoplasmáticas —condrioma, microsomas de Claude y, también, en la porción infragranular. Se encuentra además en el nucleólo y en pequeña proporción en los cromosomas (cromosoma residual).

La sustancia basófila-ergatoplasma de las células de secreción serosa y sustancia de Nissl de las neuronas fijadas, está también constituida a base de ribonucleoproteínas.

Se acepta generalmente que el A.R.N. que forma parte de estas partículas citoplasmáticas sería el responsable de la construcción específica de las proteínas en el citoplasma.

O dicho de otro modo, en ella estarían contenidos de alguna manera los patrones destinados a modelar las proteínas específicas.

¿Cuál sería el origen de este A.R.N. citoplasmático?

Hay ya base experimental para la idea de que hay paso constante de materiales desde el núcleo al citoplasma a través de varios mecanismos:

a) Extrusión nucleolar, o sea, salida de nucleólos como se ha descrito en óvulos de varias especies y en núcleos aislados de óvu-

los de anfibios; parece ser un mecanismo de excepción.

b) El microscopio electrónico parece demostrar la salida de A.R.N. en forma de macromoléculas de 70 a 150 A° a través de poros de la carioteca (de Robertis).

Además, es significativo el hecho que de todos los componentes que se encuentran simultáneamente en el núcleo y el citoplasma el único que es reemplazado a mayor velocidad en el núcleo es el A.R.N., lo que vendría a confirmar su origen nuclear.

Hay actualmente consenso para pensar que el A.R.N. es fabricado en los cromosomas por o en asociación con los genes y que, en el curso de este proceso y de alguna manera, adquiere las peculiaridades específicas del A.D.N. génico. Este A.R.N. se acumularía en él o los nucléolos y de aquí pasaría al citoplasma, especialmente a los microsomas, para darle especificidad de origen génico a las proteínas en vía de construcción.

H. Fraenkel-Conrat y colaboradores de California y Schramm y colaboradores de Tübingen han proporcionado una prueba experimental para demostrar que el A.R.N. es el responsable de la síntesis específica de proteínas. Lograron descomponer las nucleoproteínas del virus del mosaico del tabaco en su proteína y su ácido ribonucleico y luego demostraron que el A.R.N. puro era capaz de reproducir el virus al ser inoculado en una planta de tabaco sana, esto significa que es capaz de modificar el metabolismo de las células huéspedes obligándolas a sintetizar A.R.N. semejante y la proteína específica de la cepa virósica. Más aún, han logrado obtener lo que podríamos llamar virus híbridos combinando el A.R.N. de una cepa con la proteína de otra cepa y, en consecuencia, extraña para la cepa dadora del A.R.N. Al inyectar estos virus híbridos en plantas de tabaco sanas el citoplasma de las células huéspedes sintetiza la proteína original de la cepa dadora del A.R.N. y no la proteína extraña asociada con él. Se hace así evidente que las células infectadas sinte-

tizan la proteína virósica dirigida por el A.R.N. del fagos.

El trabajo incesante de bioquímicos y de otros investigadores en el campo biológico ha demostrado que la hemoglobina no es una sola sino que hay muchos tipos de hemoglobinas diferentes que son características de cada especie, algo semejante ocurre con la insulina y con muchos otros tipos de moléculas biológicamente activas.

Estos hechos sugieren que los genes controlarían la forma como los aminoácidos se unen para formar las diversas proteínas, pero no los proporcionarían. La demostración provino de Ingram de Cambridge quien descubrió que la hemoglobina que se encuentra en los eritrocitos en hoz, enfermedad letal en el hombre, no es igual a la hemoglobina de los eritrocitos normales, en efecto, el ácido glutámico que existe en esta última está substituido por valina en la hemoglobina de los hematíes enfermos. Los genetistas aceptan que el responsable del cambio es un gene simple resultante de una mutación del gene normal.

Resulta así extraordinario que un cambio en un aminoácido entre un total de más o menos 300 se traduzca en un cambio que es fatal para el individuo que lo sufre; esto demuestra, por otra parte, que los genes pueden controlar también cambios muy pequeños.

Esto ha planteado un nuevo problema: cómo se las arreglan los genes para operar tan selectivamente sobre la fina estructura de una proteína.

Benzer de Purdue ha indicado un camino de ataque al problema: pudo mapear un gen simple de un bacteriófago logrando distinguir más de cien sitios funcionales distribuidos linealmente a lo largo del gen.

Si aceptamos que los genes están constituidos de A.D.N., que de hecho en los virus y fagos la disposición lineal es manifiesta, y estando el A.D.N. constituido por filamentos de unos 20 A°, es posible establecer una relación entre el mapa de Benzer y la molécula de A.D.N. El autor calcula que la

más pequeña distancia entre dos lugares funcionales de su mapa correspondería a unos pocos pares de bases a lo largo de la doble cadena de A.D.N.

La taxonomía clásica, aquella que nació con Linneo, basó su sistema de clasificación en las características somáticas, especialmente morfológicas, más accesibles a la observación del naturalista, en esta forma se establecieron la mayor parte de las categorías sistemáticas actualmente conocidas. Es por tanto indudable que los métodos taxonómicos de base morfológica tienen ciertamente prioridad en los intentos de clasificación de cualquier grupo animal o vegetal.

Pero el extraordinario desarrollo de la genética a partir de los primeros años de este siglo vino a demostrar que las características fenotípicas eran el resultado de dos factores: la herencia (genotipo) y el medio, y que podía darse el hecho de que un mismo genotipo se expresase en diversos fenotipos y que, a la inversa, un mismo fenotipo podía corresponder a genotipos diferentes.

Es así como el criterio tipológico para caracterizar a una especie ha ido cediendo paulatinamente el paso a un nuevo criterio para definirlo: el criterio poblacional o biológico. Un número cada vez mayor de biólogos están considerando, con valor sistemático, a otras características que toman más en cuenta la individualidad química de los seres vivientes tan brillantemente puesta en evidencia por las investigaciones bioquímicas ya analizadas.

Analicemos algunos de los caminos experimentales que se han seguido:

1.—La dotación cromosómica:

Los citólogos demostraron, a base de la observación microscópica, que cada especie posee un complejo cromosómico que le es propio y en el cual el número, morfología y comportamiento de los cromosomas son características específicas.

Este complejo se forma por el aporte de un juego simple de cromosomas por parte de cada gameto, de allí que esté formado

de un cierto número de pares de cromosomas homólogos.

En el último tiempo hemos estudiado en colaboración con la Cátedra de Botánica del Instituto Pedagógico un caso que puede ilustrar este camino experimental.

En el Norte Chico, zona central y comienzos de la zona Sur de nuestro país es frecuente una plantita que los botánicos llaman *Plantago hispidula* R. et Pav. de la que existen dos formas que se diferencian en la forma de la corola, el número de semillas que encierran las cápsulas y la superficie del tallo (figs. 1, 2, 3, 4 y 5).

	TIPO 1	TIPO 2
Pétalos	Lanceolados, con la punta acuminada, más grandes	Más pequeños, anchos, obtusos
Número de semillas	Una semilla grande	Dos semillas más pequeñas
Superficie del tallo	Pelos más cortos y levantados	Pelos más largos y aplastados

Ambos tipos conviven en numerosas regiones sin que al parecer se crucen entre sí.

La sistemática de estos dos tipos es muy variada, para algunos se trata de dos especies diferentes, para otros de dos variedades de una misma especie.

Decidimos estudiar las características del cariotipo de ambas formas; la literatura nos permitió establecer que 40 especies del género *Plantago*, estudiadas, citológicamente, tenían en sus células somáticas los siguientes complejos cromosómicos:

24 especies con	2 N ==	12 cromosomas
4 " con	2 N ==	10 "
1 " con	2 N ==	18 "
8 " con	4 N ==	24 "
1 " con	4 N ==	36 "
1 " con	8 N ==	48 "
1 " con	16 N ==	98 "

De estos datos se puede deducir que en el género *Plantago* hay más de un número básico de cromosomas siendo probablemente 6 el genomio básico original con 5 y 9 como variantes.

Observando al microscopio preparaciones de extremos crecientes de raíces de semillas recién germinadas, presionadas entre porta y cubreobjeto, fijadas con una mezcla de etanol de 95° —ácido acético (1:3) y teñidas con una solución de orceína acética logramos establecer en los 2 tipos estudiados la existencia de complejos cromosómicos formados por 20 unidades en los que cada homólogo estaba repetido 4 veces. Se trataría en ambos casos de formas tetraploides con 4 genomios de 5 cromosomas cada uno.

Aparentemente no hay diferencias entre los complejos cromosómicos de ambas formas, pero si consideramos que las líneas más evolucionadas podrían distinguirse por la calidad y distribución de los genes más que por el número, tamaño y forma de los cromosomas podemos aceptar que los complejos de ambas formas pueden ser similares a la observación microscópica y no obstante ser diferentes en su contenido génico; se abre así un nuevo camino para analizar el parentesco: el camino genético.

Los evolucionistas actuales consideran que las especies son estados transitorios, estados de divergencia, algo que varía en el tiempo y en el espacio.

Las especies son en su mayor parte poblaciones heterocigóticas, de allí que los genes puedan segregarse y originar nuevas combinaciones; esta posibilidad de recombinación génica y la existencia de mutaciones hacen que las especies sean poblaciones polimórficas que contienen genotipos diferentes, lo que significa que hay en ellas una reserva de genes que representan capacidades adaptativas.

Si el polimorfismo es adaptativo resultan poblaciones con frecuencia de genes diferentes —razas geográficas— que al quedar aisladas pueden diferenciarse genéticamente en tal forma por la falta de intercambio de

genes que el entrecruzamiento no se haga posteriormente posible aunque lleguen a estar juntas.

Un caso muy interesante es el estudiado por Moore en Estados Unidos en la llamada "Rana Leopardo" —*Rana pipiens* Schreber— de las que hay poblaciones que se extienden desde Vermont en el Norte hasta la península de Florida; los individuos de poblaciones vecinas intercambian genes, o sea, se cruzan entre sí, pero los de las dos poblaciones extremas no lo hacen.

De acuerdo con este criterio las razas serían sistemas genéticos abiertos, en los que hay aún posibilidades de intercambio de genes, las especies serían, en cambio, sistemas genéticos cerrados.

Sería, en consecuencia, interesante cruzar los dos tipos de *Plantago hispidula* a que nos hemos referido y hacer posible la formación de híbridos fértiles que demostren que los dos genomios básicos reunidos son lo suficientemente semejantes para interactuar en equilibrio permitiendo el desarrollo ontogenético, y el logro del estado adulto, dando lugar, a su vez, a la formación de gametos balanceados, viables que llevaran a la obtención de generaciones sucesivas. Por el contrario si los dos tipos tienen genotipos diferentes no habría posibilidades de formación de híbridos fértiles.

Podríamos estar así frente a un caso sumamente interesante de especiación en que se habrían reunido todas las condiciones —adaptación al habitat, capacidad de competencia, fertilidad sexual— para que el nuevo tipo génico formado pudiera establecerse como especie diferente en la naturaleza.

Un nuevo enfoque experimental del problema lo constituye el empleo de métodos serológicos destinados a determinar las características antigénicas.

Estos métodos serológicos revelan la naturaleza y el significado de las proteínas por medio de reacciones producidas mediante la utilización de antisueros obtenidos contra ellas; la tan conocida reacción antígeno-anticuerpo.

Según Charles Leone, de Kansas, el empleo de métodos serológicos en la investigación de problemas de parentesco: "representa una de las primeras tentativas de colocar en el plano de lo objetivo, de la verificación experimental, aspectos de la zoología que anteriormente eran descriptivos y subjetivos en su interpretación".

Se trata, pues, de comparar proteínas correspondientes entre diferentes animales a través de varios caminos:

a) Test interindividuales, o sea, entre individuos de una misma especie.

b) Test entre individuos de especies diferentes.

c) Comparaciones entre categorías sistemáticas más elevadas, Géneros, Familias, Tribus, Ordenes, Clases diferentes.

Los materiales biológicos más usados como antígenos son el suero sanguíneo y extractos salinos de células, tejidos u órganos.

En esta forma se ha establecido muy bien la propiedad antigénica de las proteínas de la membrana plasmática para los grupos sanguíneos y en estudios parasitológicos. Además, se ha hecho gran uso de las proteínas del grupo sanguíneo en investigaciones antropológicas.

Los primeros ensayos se hicieron con el método de precipitación en pequeños tubos de vidrio, en esta forma, Nuttal pudo inferir que el tamaño del anillo formado o el grado de turbidez, lo que está en relación con la cantidad de precipitado producido al poner en contacto extractos homólogos de tejidos de los grupos en discusión frente a un mismo antisuero, es un índice del grado de parentesco que existe entre dos o más individuos o dos o más grupos taxonómicos diversos.

Audin en 1948 observó que al colocar en gelatina una mezcla de antígenos y ser puesta luego en contacto con el antisuero respectivo daba lugar a una serie de fenómenos de precipitación fraccionada. La distancia entre las fracciones está determinada por la velocidad de difusión de los antígenos con-

dicionada a su vez por sus masas moleculares y sus grados de difusión.

Ouchterlony el mismo año modificó el método utilizando placas de Petri con gel de Agar, permitiendo así la comparación simultánea de varias soluciones de antígeno con respecto a un mismo grupo de anticuerpos; como cada antígeno y anticuerpo difunde con una velocidad específica a través del Agar, en el punto donde se encuentran un antígeno con su respectivo anticuerpo se produce una línea o trazo de precipitación. En esta forma se puede determinar cuantitativamente el número de antígenos que hay en una mezcla siempre que estén presentes los respectivos anticuerpos.

Los resultados obtenidos han sido de gran interés habiéndose logrado demostrar diferencias aun entre individuos de una misma especie y se ha hecho posible agrupar especies diversas al margen de lo que establecen las líneas filéticas clásicas.

Esta misma técnica se ha aplicado también al estudio del desarrollo ontogénico con el nombre de Inmunoembriología.

Dos han sido los caminos que se han usado con más éxito:

a) Uso de antisueros obtenidos contra extractos de proteínas de tejidos y órganos de adultos para identificar la aparición de proteínas semejantes al adulto en los diversos estadios del desarrollo del embrión.

b) Uso de sueros antiembrión apropiados para determinar hasta qué punto existen verdaderas proteínas embrionarias.

Así se ha logrado constatar que:

1.—Ya en el cigoto hay proteínas semejantes a la del adulto las que no se diferencian en el curso del ciclo vital.

2.—La aparición de otras proteínas está asociada a la aparición de ciertas estructuras morfológicas y, en consecuencia, las preceden.

3.—Algunas proteínas son órgano-específicas, otras están distribuidas diferencialmente entre los diversos órganos y otras en todo el organismo.

Por último se ha empleado las reacciones

antígeno-anticuerpo para obtener información genética, esto constituye la llamada Inmunogenética.

La experiencia recogida hasta el momento parece demostrar que:

1.—La serología pone en evidencia una estrecha correspondencia entre la similaridad antigénica y las relaciones taxonómicas y evolutivas.

2.—La especificidad de los antígenos cae dentro del patrón de la herencia mendeliana, es decir, hay estrechas relaciones entre genes y antígenos y, además, se ha demostrado que estas características no son modificables por los factores ambientales.

Partiendo de estos dos principios nos pareció de interés el estudio serológico de poblaciones de *Bufo spinulosus* —“Sapo de rulo”— ajustados a 3 diferentes condiciones ambientales, trabajos que realizamos en colaboración con el Laboratorio de Inmunogenética del Dr. G. Hoecker, dependiente de la cátedra de Biología del profesor G. Gasic y en el cual tuvo activa participación el miembro de nuestro Centro, profesor Mario Rosenmann.

Chile es un país en que por razones geográficas obvias se crean condiciones especiales para el aislamiento de poblaciones en nichos ecológicos de diferentes características, dando lugar a procesos de divergencia evolutiva tanto de Norte a Sur, como de cordillera a mar.

Utilizamos en estos experimentos individuos de *Bufo spinulosus* pertenecientes a 3 poblaciones: márgenes del río Copiapó, quebradas húmedas de la zona de Zapallar, bosques de los alrededores de Concepción, los que muestran diferencias morfológicas notables como se puede observar en la figura 6.

Utilizando la técnica de Ouchterlony, se colocó en cavidades excavadas en forma equidistante en cápsulas de Petri con solución de agar al 10% adicionada de merthiolate sólido Lilley en proporción 1:10.000, suero de individuos de las poblaciones de Zapallar, Copiapó y Concepción frente a suero anti-*Bufo spinulosus* de Zapallar obteni-

do por inyección intraperitoneal repetida de suero de *Bufos* de Zapallar en conejo (fig. N.º 7).

Al cabo de 3 días aparecieron en los 3 sectores correspondientes dos líneas de precipitación que podrían denominarse A y B, al 5.º día aparece un nuevo trazo que denominamos C, hacia el 12 día aparece un cuarto trazo: D y por último hacia el 15 día el trazo A aparece fragmentado en dos: A y A' y el C igualmente en dos: C y C'.

Pudimos así diferenciar tres grupos de antígenos comunes a los sueros de los individuos de las 3 poblaciones estudiadas:

1.—Un primer grupo de antígenos que podríamos llamar livianos, de difusión rápida, ya que aparecen a los tres primeros días de iniciados los experimentos, el que estaría integrado por los trazos A, A' y B y que parecen ser proteínas de pesos moleculares muy semejantes ya que precipitan al final formando un solo bloque de límites no bien diferenciables.

2.—Un segundo grupo de antígenos que podríamos llamar medios el que estaría formado por los trazos C y C' los que difunden a mediana velocidad (5 días).

3.—Finalmente un grupo de antígenos que podríamos llamar pesados por su difusión lenta (10 a 12 días) y representados por el trazo D (fig. 8).

Aunque los resultados no indicaron diferencias cualitativas entre los sueros de los individuos de las 3 poblaciones, lo que estaría indicando una franca identidad en los grupos antigénicos de cada una de ellas, fué posible verificar la existencia de alguna diferencia de orden cuantitativo. Los precipitados de la zona de antígenos medios son algo más abundantes en los individuos provenientes de Zapallar y los de la zona de antígenos pesados lo son igualmente en los sectores correspondiente a los sapos de Zapallar y Concepción.

A fin de detectar la posible existencia de antígenos diferenciales que pudieran haber pasado inadvertidos, decidimos hacer una absorción de anticuerpos, mezclando el sue-



ro anti-*Bufo spinulosus* Zapallar con suero de Copiapó y suero de Concepción respectivamente, manteniéndolos en contacto durante 72 horas a 40° C.; después de centrifugar probamos ambos sobrenadantes con suero de individuos de Copiapó y Concepción en cápsulas de Petri con gel de agar. En ninguna placa obtuvimos la formación de línea de precipitación; los sueros de los *Bufos spinulosus* de Copiapó y de Concepción contienen los mismos antígenos que el suero de los individuos de Zapallar. Se hace así evidente la analogía serológica de los individuos de Copiapó y de Concepción con referencia a los de Zapallar.

La feliz coincidencia de haber dispuesto de un cierto número de individuos de la especie argentina —*Bufo arenarum*— gentilmente enviados desde Mendoza por el Dr. J. M. Cei nos permitió someter a test el suero de estos ejemplares frente al suero anti-*Bufo spinulosus* de Zapallar.

Las series experimentales realizadas demostraron la presencia, en los individuos de la especie argentina de la población de Mendoza analizada, de los siguientes antígenos comunes a *Bufo spinulosus*:

1.—Antígenos livianos de difusión rápida representado por los trazos de precipitación  $\alpha$   $\alpha'$  y  $\beta$  que corresponden a los trazos A, A' y B de *spinulosus*.

2.—Antígenos medios representados por el trazo  $\gamma$  (análogo a C).

3.—Antígenos de difusión lenta representados por la línea de precipitación  $\delta$  (análoga a D).

En consecuencia, faltarían en *B. arenarum*, en relación al suero anti-*Bufo spinulosus*: una porción de antígenos medios, la correspondiente al trazo C' y una leve fracción de antígenos livianos, ya que el grosor del trazo común  $\alpha + \alpha'$  es menor que el grosor del mismo trazo en *B. spinulosus*.

Probamos a continuación la posibilidad experimental de reemplazar el suero sanguíneo por un extracto de hígado en suero fisiológico al 8,5% (1:9). Los resultados ob-

tenidos al someter a test estos extractos frente a suero anti-*Bufo spinulosus* de Zapallar fueron tan evidentes como aquellos obtenidos con suero y mostraron una analogía bastante grande; a más de las líneas de precipitación que ya habíamos individualizado apareció un nuevo trazo que denominamos B C y el trazo D se escindió en dos: D y D'.

Este hecho es muy importante desde un punto de vista práctico ya que hay especies de anfibios anuros tan pequeños: *Pleurodema bibroni* —“sapo de 4 ojos”—, *Eupsophus taeniatus*, *Rhinoderma darwini* —“Ranita de Darwin”— en la cual sería un difícil problema obtener la cantidad suficiente de suero para realizar el test.

Para probar el valor del método como herramienta destinada a revelar parentesco decidimos enfrentar el suero anti-*Bufo spinulosus* a extracto de hígado de individuos de *Pleurodema bibroni* de una población de los alrededores de Santiago. Al cabo de siete días apareció una línea de precipitación ubicada en la zona que corresponde a los antígenos medios (C + C') de *B. spinulosus*. Este fué el único trazo de precipitación que se obtuvo después de 20 días. Esto estaría indicando que hay sólo un lejano parentesco entre estas dos especies, pertenecientes no sólo a dos géneros distintos sino a dos familias diferentes: *Bufo* y *Leptodactylidae* (fig. 9).

Por último, se sometió a test suero humano del grupo 3 frente al suero anti-*Bufo spinulosus* no lográndose observar línea alguna de precipitación como era dable esperar en especies tan distintas dentro del Sub-Phylum Vertebrados.

No hay duda que el método de análisis antigénico en medio gelificado demostró, en estas series experimentales, ser una herramienta de trabajo muy útil en el estudio experimental de problemas filogenéticos, confirmando el principio general de que el grado de reacción precipitante es proporcional al grado de parentesco de las especies o poblaciones sometidas a test.

Analicemos en seguida un tercer camino

experimental. Es un hecho evidente que la Biología actual se está acercando más y más a los niveles macromoleculares y moleculares; basta considerar que la Genética se está preocupando cada vez más de grandes polímeros, ligando el control de la vida a moléculas gigantes, los ácidos nucleicos.

De esto ha nacido la necesidad de determinar qué características sistemáticas podrían ser factibles de ser evaluadas al nivel molecular y macromolecular. La realización de esta meta requeriría el uso de una técnica que permitiese separar esa mezcla compleja de moléculas y macromoléculas, algunas de ellas altamente específicas, que constituyen el protoplasma.

Una de las soluciones que se ha encontrado ha sido la utilización de la cromatografía de partición sobre papel aprovechando las diferencias de movilidad de compuestos relacionados estructuralmente cuando se disuelven en un solvente orgánico, saturado de agua, que migra a lo largo de una hoja de papel filtro debido a la capilaridad.

Tres son los procedimientos que se han puesto en práctica:

a) Cromatografía por ascenso. La hoja de papel Whatman con las muestras problemas se hacen contactar por su borde inferior con el recipiente que contiene la fase orgánica. Este método requiere el uso de cámaras herméticas y una temperatura ambiente estable.

b) Cromatografía por descenso. En este caso la hoja portadora de las muestras se pone en contacto con el solvente orgánico por su borde superior. Tiene la ventaja de que es más rápido y permite trabajar con éxito a la temperatura ordinaria. La separación es también mayor.

c) Cromatografía bidimensional. Consiste en hacer dos separaciones sucesivas en una misma hoja de papel filtro, utilizando dos solventes, uno básico y el otro ácido, que actúan en dos direcciones diferentes separados por un ángulo de 90°. Con este método se logra la máxima separación.

El material biológico utilizado ha sido muy variado, principalmente tejidos somá-

ticos: muscular, hígado, riñones, páncreas, pulmones; también se ha utilizado material germinal, especialmente testículos.

En un comienzo se procedió a comprimir directamente un trocito de tejido sobre el papel filtro el que, luego se dejaba secar a la temperatura ambiente.

De la impregnación directa se pasó al empleo de extractos de macerados de tejidos. El uso de estos homogenizados permite calcular mejor la concentración de las muestras a través de la utilización de micropipetas; tiene además la ventaja de que los extractos se pueden conservar en una refrigeradora.

El material biológico utilizado puede ser macerado sin lavado previo, vale decir, impregnado de sangre y líquido intersticial o bien sometido previamente a un lavado en agua destilada o en suero fisiológico adecuado. Igualmente la molienda puede hacerse usando como vehículo agua destilada, suero fisiológico o etanol. Como es lógico suponer la separación es diferente según el solvente usado.

También es posible someter previamente el material biológico a un proceso de hidrólisis ácida en caliente con el objeto de desdoblarse los diversos constituyentes proteicos. El proceso adquiere así mayor valor analítico porque permite establecer diferencias en cuanto al contenido en aminoácidos, pero pierde valor taxonómico.

La naturaleza de la fase orgánica es muy variada, las más comúnmente usadas son mezclas a base de butanol normal, de éter de petróleo, fenol saturado en agua, etc. Para el revelado químico de los grupos polipeptídicos, ácidos aminados y proteínas se usa soluciones de ninhidrina en etanol. Paralelamente al revelado químico puede procederse al revelado con lámparas de luz ultravioleta de longitud de onda adecuada.

La cromatografía de partición sobre papel puede combinarse con métodos cuantitativos como ser la determinación del N total en trocitos de tejidos por unidad de volumen por el método del micro-Kjeldahl.

En nuestros laboratorios hemos estudiado, en un comienzo, mediante la cromatografía ascendente extractos musculares, hepáticos y testiculares de individuos de *Bufo spinulosus* de la zona central y de *Bufo arenarum* de una población de Mendoza y de una población de las sierras de Córdoba (Argentina).

Los experimentos realizados permitieron observar que, por un lado, las dos especies estudiadas dan lugar a la formación de patrones cromatográficos bastante semejantes en su arquitectura general, indicio de los estrechos lazos filogenéticos que existen entre ellas. Esta similitud estaría en efecto indicando que su organización bioquímica coincide en sus rasgos fundamentales. Pero, por otro lado, es evidente que hay diferencias suficientes en los cromatogramas para que se revele claramente la individualidad bioquímica gobernada genéticamente, propia de cada especie.

Es interesante hacer notar que los mejores resultados se obtuvieron en extractos de tejidos somáticos —músculo, hígado—, lo que reafirma las opiniones de Traverso-Buzzatti de que hay individualidad metabólica en individuos genéticamente distintos.

En cambio, los resultados obtenidos con extractos testiculares fueron bastante pobres, esto se debe posiblemente a que sea necesario lograr previamente una mayor simplificación de las macromoléculas nucleoproteicas y complementar las técnicas cromatográficas por ascenso con los de descenso y bidimensional para lograr una mejor separación.

En este último tiempo hemos estado aplicando los diversos procedimientos cromatográficos al estudio de las secreciones venenosas producidas por las glándulas parótidas en dos especies de *Bufos* chilenos: *Bufo spinulosus* y *Bufo variegatus* con el fin de establecer si las diferencias interespecíficas se pueden hacer evidentes, ya no con tejidos somáticos sino en algunos tipos especiales de secreciones como lo son los venenos en los sapos.

Los resultados logrados con cromatografía ascendente biunidimensional, es decir, ha-

ciendo migrar dos veces el mismo solvente, mostraron ya diferencias las que se acentuaron al obtener los patrones de las respectivas secreciones por cromatografía descendente y bidimensional. La figura 10 reproduce los patrones cromatográficos obtenidos por cromatografía ascendente y biunidimensional.

Interesantes fueron los resultados de trabajos experimentales que se hicieron en colaboración con la Sección Físico-Química del Instituto Bacteriológico dirigida, por la profesora G. Leyton y en los que tuvo activa participación el ayudante de este departamento, profesor Francisco Silva.

Sometieron a estudio cromatográfico extractos de tejido muscular de dos roedores autóctonos chilenos: *Octodon degus degus* —“Degu”— y *Abrocoma bennetti bennetti* —“Ratón Chinchilla”— que son dos especies cercanamente emparentadas, obteniendo patrones o mapas cromatográficos que permiten identificarlos, por lo menos a través del empleo de métodos de cromatografía bidimensional.

Efectivamente los patrones cromatográficos obtenidos por ascenso y descenso son extraordinariamente semejantes lo que estaría revelando una gran semejanza en la composición proteica del tejido muscular de ambos roedores, lo que, a su vez, sería expresión de los cercanos lazos filogenéticos existentes entre ellos. Sólo es posible apreciar diferencias cuantitativas en la intensidad de la coloración de las manchas de los patrones. La mayor intensidad en las manchas de *Abrocoma* que de *Octodon* se debería a la existencia de mayor cantidad de material proteico, comprobado a través del análisis de micro-Kjeldahl. El contenido de Nitrógeno total en las proteínas musculares por cm. cúbico de *Abrocoma b. bennetti* es casi el doble del que existe en su pariente *Octodon d. degus*.

La cromatografía bidimensional permitió evidenciar claramente que hay grupos proteicos distintos en ambos patrones, como se puede observar en el esquema adjunto (figura 11).

Estos resultados estarían significando que a pesar del cercano parentesco que existen entre estas especies habría base cromatográfica suficiente para asegurar que *Octodon d. degus* y *Abrocoma b. bennetti* tienen distinta especificidad química revelada por patrones cromatográficos diferentes.

Estas conclusiones vienen a reforzar la ubicación que la taxonomía asigna a los dos roedores estudiados en sendas categorías sistemáticas estrechamente vinculadas.

Por último, se ha intentado aplicar datos fisiológicos a la resolución de problemas de índole taxonómico. Entre estas tentativas es interesante la utilización de la vibración sexual preventiva —“warning vibration”— reflejo provocado por la estimulación de determinadas áreas musculares en la región dorsal y lateral de algunos géneros de anfibios y considerado primero como carácter sexual secundario en los machos y luego como carácter ambosexual.

El registro de estas vibraciones mediante el uso de un electroquímógrafo demuestra que la frecuencia y la amplitud del trazado son características para cada especie y al mismo tiempo que hay cierta diferencia entre los sexos.

J. M. Cej y S. Espina han estudiado este carácter en diversas poblaciones de *Pleurodema bibroni* y de *Bufo spinulosus*, encontrando que en esta última especie la vibración preventiva se mantiene como carácter sistemático, acercándola a los *Bufos* del gru-

po marinus-paracnemis-arenarum y alvarius, neotropicales y sonoranos.

A través de los caminos señalados y de muchos otros que sería largo señalar la moderna taxonomía va lentamente avanzando y tratando de acumular un número cada vez mayor de datos que le permitan llegar a una clasificación de los seres vivos en que los datos morfológicos tengan cada vez menos importancia y en cambio estos enfoques modernos que revelan la individualidad bioquímica de las especies constituyan la base fundamental en la determinación de los lazos filogenéticos.

Es así como paulatinamente el criterio tipológico para caracterizar la especie ha ido cediendo el paso a un criterio poblacional o biológico en el que la especie aparece como un sistema genético cerrado, en el que un conjunto de genes, de mensajes específicos en interacción con los factores del medio ha dado lugar a la formación, a lo largo del desarrollo ontogenético, de entidades dinámicas, en las que el cambio permanente es la única realidad y que, sin embargo, conservan su individualidad bioquímica inalterable.

Cuán lejos estamos de esa época en que la realidad taxonómica eran los individuos estáticos conservados en frascos llenos de líquidos y encerrados en los armarios de los museos o traspasados por alfileres y ordenados en interminables filas en las frías cajas de los insectarios.

#### REFERENCIAS

1. Ball, G. H. y E. W. Clark, 1953. *Systematic Zool.*, 2 : 138.
2. Boyden, A., *Serology and Animal Systematics*. “The American Naturalist”. Vol. LXXVII : 234.
3. Boyd, W. C., 1947. *Fundamentals of Immunology*. Interscience Publishers Inc. New York.
4. Block, R. J., E. L. Durrum y G. Zweig, 1955. *A manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. Acad. Press. N. York.
5. Buzzatti-Traverso, A. A., 1953. *Nature*, 171 : 4352. *Science*, 117 : 3029.
- (6) Id., 1953. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 39 : 376.
7. Buzzatti-Traverso, A. A. y A. B. Rechnitzer, 1953.
- (8) Capurro, L., H. Gunkel y U. Levi, 1958. *La sistemática de Plantago hispídula desde un punto de vista morfológico, cromosomal y cromatográfico* (en prensa).
9. Capurro, L. y M. Rosenmann, 1957. *Formación de anticuerpos en Cricetus auratus*. *Inv. Zool. Chilenas*, Vol. III : 111-113.
10. Capurro, L. y F. Silva, 1958. *La cromatografía de partición sobre papel en la investigación de los lazos filogenéticos en dos especies del género Bufo*. *Inv. Zool. Chil.* (en prensa).
11. Capurro, L. y F. Silva, 1958. *Estudio cromatográfico del veneno de dos especies chilenas del género Bufo*. *Inv. Zool. Chilenas* (en prensa).
12. Colin, E., 1956. *Elements of Genetics*. M. Graw-Hill, New York.
13. Crick, F. H. C., 1957. *Scientific American*, 197 : 3.
14. De Robertis, Nowinsky y Sáez, 1955. *Citología General*. Buenos Aires.
15. Doty, P., 1957. *Scientific American*, 197 : 3.

16. Dobzhansky, T., 1955. *Genética y el origen de las especies*. Ybis. Madrid.
17. Id., 1957. *Evolution. Genetics and Man*. J. Wiley. New York.
18. Finley, H. E. y H. B. Williams, 1955. *J. Protozool.*, 2 : 13.
19. Fox, A. S., 1956. *Science*, 123 : 3187.
20. Genneroy, D., A. Boyden y R. De Falco, 1953. *Serología Comparada de los Primates*. Intern. Cong. Zool. Copenhagen.
21. Grabar, P. y C. A. Williams, 1953. *Biophys. Bioch. Acta*. 10 : 193.
22. Id., 1955. *Biophys. Bioch. Acta*, 17 : 67.
23. Id., 1955. *H. J. Immunol.* 74 : 188.
24. Id., 1955. *H. J. Immunol.* 74 : 397.
25. Id., 1955. *H. J. Immunol.* 74 : 404.
26. Gundersen, A., 1950. *Families of Dicotiles*. Waltham, Mass.
27. Huxley, J., 1953. *Evolution in action*. Harper, New York.
28. Haldane, J. B. S., 1954 *The Biochemistry of Genetics*. Allen and Unwin. Londres.
29. Irwin, M. L., 1953. *Evolution*, 7 : 31-50.
30. Leone, C., 1953. *Serology and Zoological Problems*. Intern. Cong. Zool. Copenhagen.
31. Id., 1953. *Estudios serológicos comparativos entre algunos artrópodos no cercanamente relacionados*. Intern. Cong. Zool. Copenhagen.
32. Mayr, E., 1952. *Systematic and the origin of species*. Columbia Univ. Press. New York.
33. Mc. Elroy, 1961. *Cellular Physiology and Biochemistry*. New Jersey.
34. Micks, D. y J. P. Ellis, 1951. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 78 : 69.
35. Oudin, J., 1947. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29 : 140-149.
36. Id., 1948. *Ann. Inst. Pasteur*, 75 : 30-51.
37. Id., 1952. *Methods in Med. Res.*, V, 335.
38. Ouchtehlony, O., 1948. *Ark. Kem.*, 26 B. 16.
39. Pilger, R., 1928. *Die Gattung Plantago in Zentral und Südamerika*. Eng. Bot. Jahrb., LXII, 40-43.
40. Plaza de los Reyes, M., 1955. *Metabolismo de los ácidos nucleicos*. Imp. Universitaria. Santiago de Chile.
41. Rechnitzer, A. B., 1953. *Uso de la cromatografía de partición sobre papel en estudios taxonómicos*. Intern. Cong. Zool. Copenhagen.
42. Rosenmann, M., Capurro, L. y Hoecker, G., 1958. *Aplicación de métodos de precipitación en medio gelificado a la resolución de problemas filogenéticos en el género Bufo* (en prensa).
43. Sharp, L., 1947. *Fundamentos de Citología*. Acme Agency. Buenos Aires.
44. Silva F., 1957. *Aplicación de la Cromatografía en Papel a problemas taxonómicos*. Tesis de Prueba. Instituto Pedagógico de la Universidad de Chile.
45. Sinnot, Dunn y Dobzhansky, 1950. *Principles of Genetics*. New York.
46. Simpson, G. G., 1940. *The meaning of Evolution*. Yale University Press. New Haven.
47. Id., 1953. *The major features of Evolution*. Columbia University Press. New York.
48. Weisz, Paul B., 1959. *The Science of Biology*. Mc. Graw-Hill. New York.
49. Wilson, M. W. y B. Pringle, 1954. *J. of Immunology*, 73 : 232-243.



Fig. 1.—*Plantago hispidula*, R. et Pav. Tipo 1.



Fig. 2.—*Plantago hispidula*, R. et Pav. Tipo 2.



Fig. 3.—Forma de la corola en *Plantago hispidula*. Tipo 1 (izquierda) y tipo 2 (derecha). (Muy aumentadas).

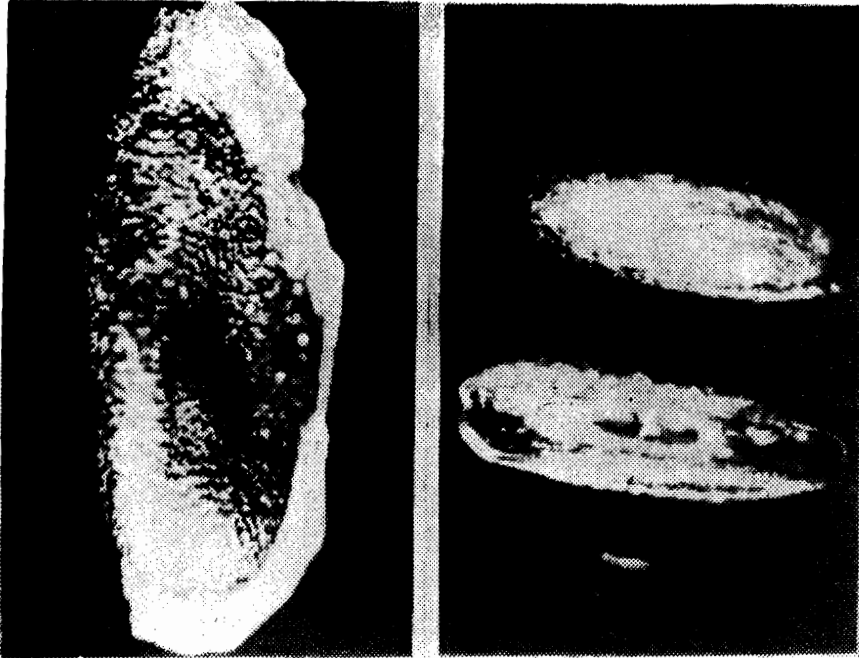


Fig. 4.—Semillas de *Plantago hispidula*. Una grande en el tipo 1 (izquierda), dos más pequeñas en el tipo 2 (derecha). (Muy aumentadas).

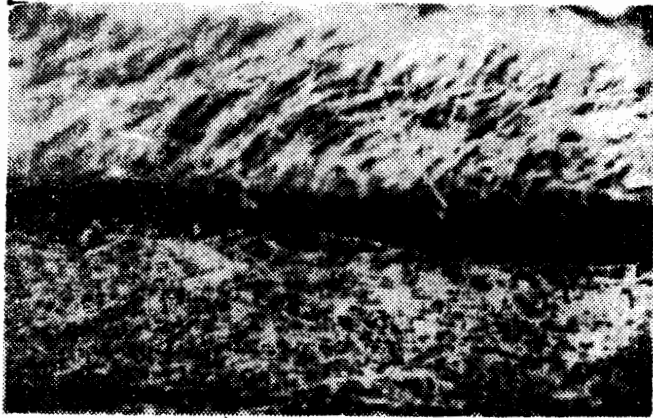


Fig. 5.—Superficie del tallo en *Plantago hispidula*. Tipo 1 (arriba) y tipo 2 (abajo).

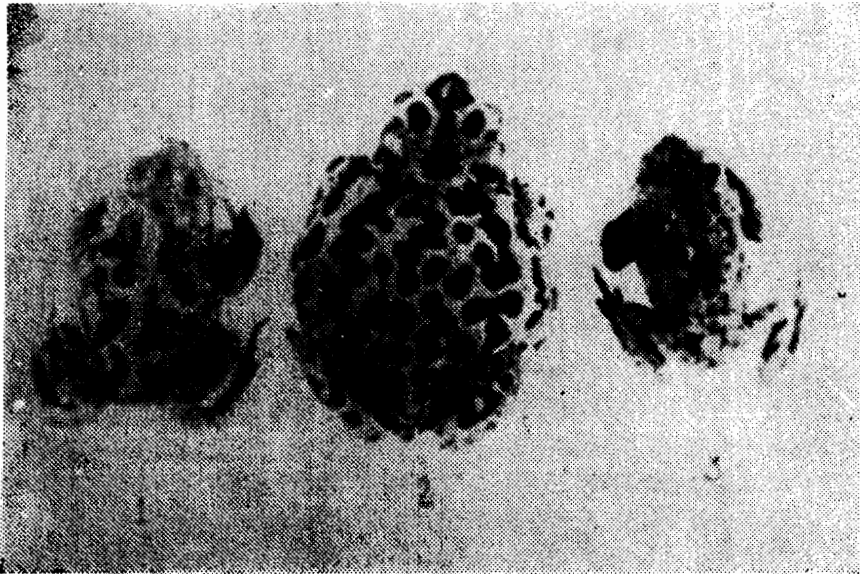


Fig. 6.—Poblaciones de *Bufo spinulosus*: 1) Río Copiapó; 2) Alrededores de Zapallar, y 3) Alrededores de Concepción.

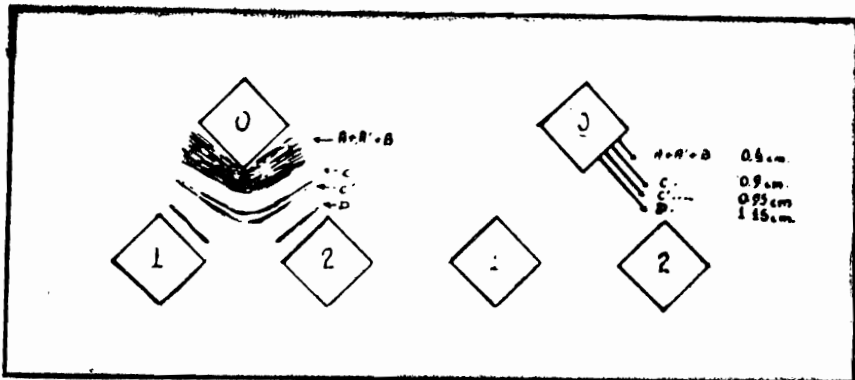


Fig. 7.—Esquema de los resultados obtenidos al someter a test suero de *Bufo*s de las poblaciones de Zapallar (cavidad 1) y de Copiapó (cavidad 2), frente a suero *antiBufo* de Zapallar (cavidad cero)



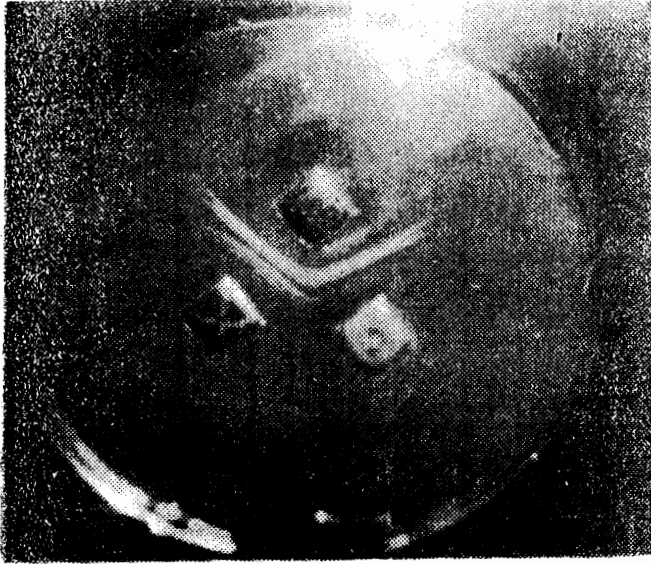


Fig. 8.—Placa de Petri con gel de agar que muestra las líneas de precipitación que se obtienen al someter a test suero de las diversas poblaciones estudiadas con suero *antiBufo* de Zapallar.

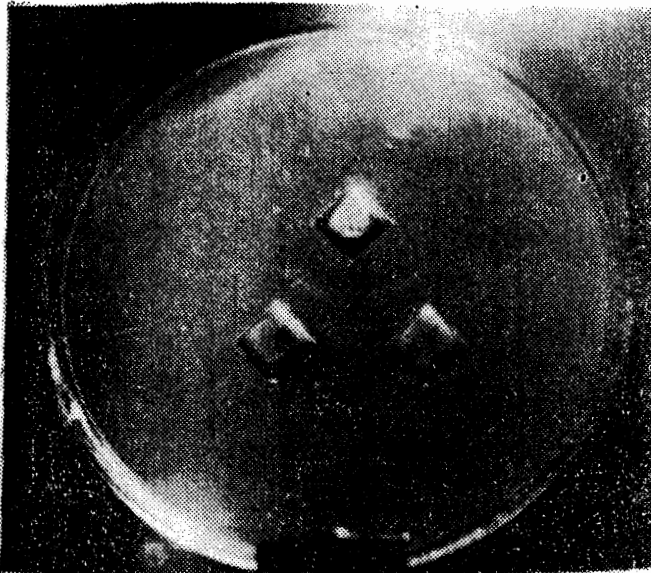


Fig. 9.—Placa de Petri con gel de agar que muestra la única línea de precipitación obtenida al enfrentar suero de *Pleurodema bibroni* —sapo de 4 ojos— con suero *antiBufo* de Zapallar.

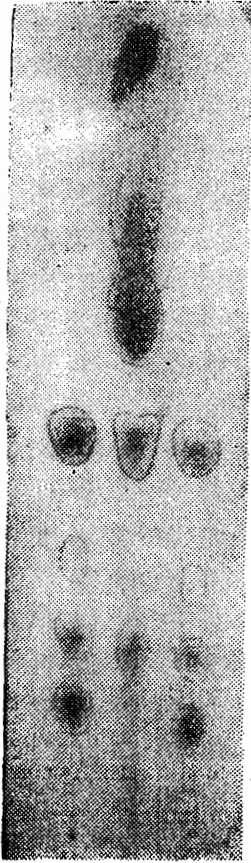


Fig. 10.—Cromatograma ascendente biunidimensional obtenido con venenos de *Bufo spinulosus* (columnas 1 y 3) y de *Bufo variegatus* (columna 2). Solvente: n-butanol, ácido acético, agua; revelador: ninhidrina.

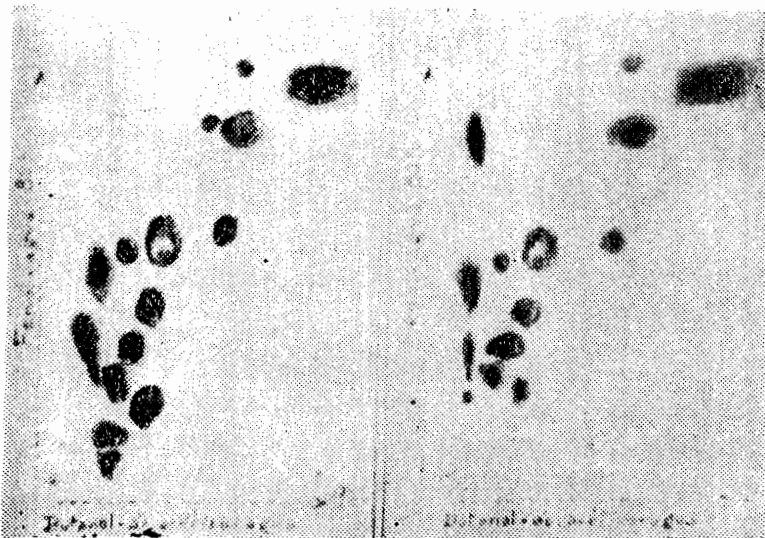


Fig. 11.—Esquema que muestra los resultados obtenidos por cromatografía bidimensional con extractos musculares de *Octodon d. degus* y *Abrocoma b. benetti*.