

VARIACIONES INTRAPOBLACIONALES DE PATRONES
ELECTROFORETICOS SEROPROTEINICOS EN
BUFO ARENARUM

RAQUEL COHEN DE HUNAU

SUMMARY

Intrapopulation variability of seroproteinic electrophoretic patterns in *Bufo arenarum*.— The intrapopulation variation of the electrophoretic pattern of *Bufo arenarum* Hensel seroproteins found in the Mendoza region, allows us to recognize four main groups, based on differences of density and unfolding of the bands which are characteristic of the albumin-globulin system inherent in this species. These groups are distributed in different proportions, which present a certain analogy to that observed by other authors in *Bufo valliceps* in the United States, and are apparently independent of sex. The limitations of intrapopulation variation must be taken into account in comparative analyses of the taxonomic meaning of the specific patterns pertaining to these proteins.

La electroforesis en gel de acrilamida al par que la del gel de almidón, ha resultado en el desarrollo de la sistemática no morfológica un auxiliar poderoso e indispensable por su poder de resolución. Mediante ella es posible, en el estudio de muestras poblacionales establecer diferencias o semejanzas en los patrones proteínicos de individuos de una misma especie o de especies diferentes pero filogenéticamente relacionados (Brandt y col. 1952; Fox, Dessauer y Maumus, 1961).

Los datos presentados en este trabajo, son el resultado del estudio de los patrones electroforéticos de muestras poblacionales de *Bufo arenarum* de Mendoza, en los que se determinó además la presencia de las manchas amarillas de la piel y la manifestación en la casi totalidad de los ejemplares de reflejos catatónicos, características descritas por Cei en esta población, a los efectos de descartar posibles relaciones entre estos caracteres y el equilibrio plasmático.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 60 ejemplares de *Bufo arenarum* adulto de Mendoza; 30 ♂ y 30 ♀ recolectados en los alrededores de la ciudad.

Se obtuvieron muestras individuales de sangre mediante punción cardíaca y previa centrifugación, los sueros fueron conservados en el freezer hasta el momento de ser utilizados.

La gelificación y posterior corrida se hizo en un sistema de tubos verticales en condiciones constantes de corriente: 30 mA y 250 voltios durante 50 minutos. El buffer utilizado, tris-glicina pH 8.3. La coloración de los geles se realizó con Amido Schwarz al 1 % en ácido acético al 7 %, quedando de esta forma reveladas las distintas bandas de proteínas. Los resultados aquí expuestos son hasta ahora cualitativos, en espera de proceder luego a la cuantificación mediante densitometría.

RESULTADOS

La electroforesis en papel de estos batracios reveló cuatro bandas gruesas de proteínas, que en el orden de su mayor movilidad fueron señaladas como A (albúmina); G', G'', G''' (globulinas) (Bertini y Cei, 1960); pero no presentan diferencias fundamentales en sus patrones específicos individuales, debido quizás a la escasa resolución de esta técnica.

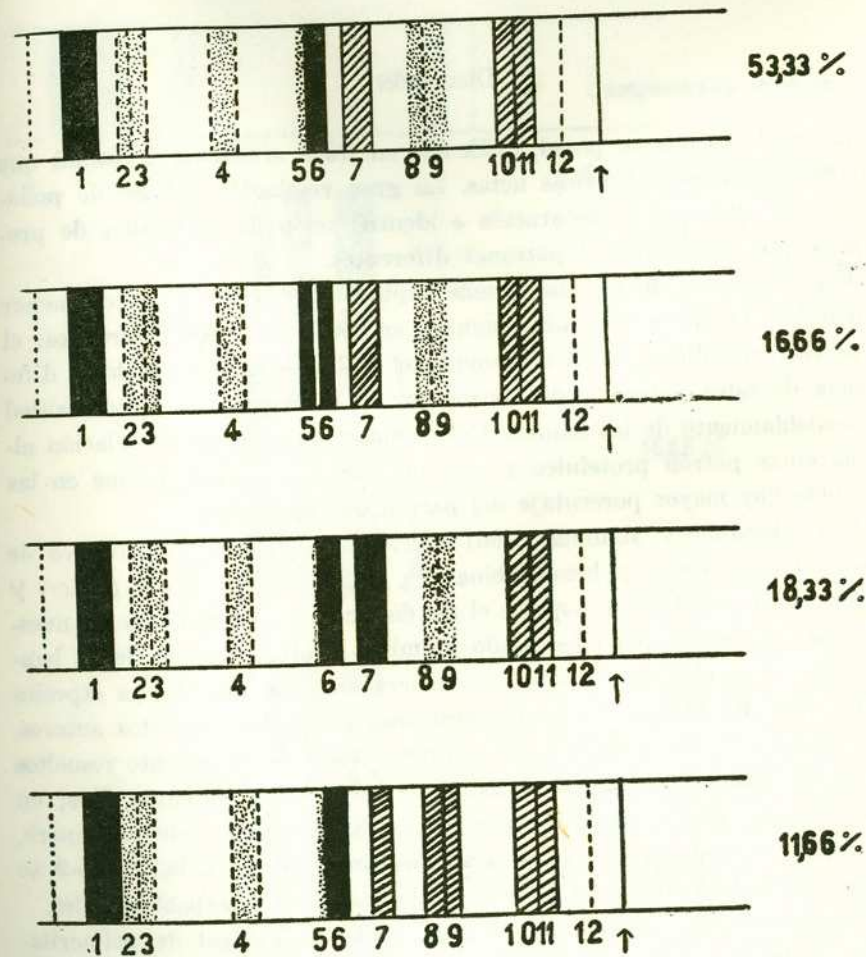
Mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida fueron identificadas doce bandas, que por su intensidad y disposición pueden reunirse en 4 patrones diferentes.

En todos los casos, la banda 1, de mayor movilidad, correspondiente a la albúmina, se presenta en la mayoría de los ejemplares ♂ y ♀ con igual intensidad de concentración y velocidad de corrimiento. Las bandas 2, 3 y 4 que migran en la zona de la post-albúmina, forman un 1er. grupo que es constante en disposición y características en los 4 tipos de patrones observados; se resuelven todas como áreas difusas.

Un 2do. grupo es el constituido por las bandas 5-6; 7 y 8-9; son las que con su distinta forma de manifestarse resultan de utilidad para distinguir los diferentes patrones intrapoblacionales entre sí.

Las fracciones de esta zona del gel, son las que se presentan más netamente definidas en resolución y coloración con respecto a otras bandas del mismo. Los patrones determinados aparecen en la figura 1. La banda 6 del 2do. grupo es neta aunque no muy ancha en todos los casos; en un 16 % de ellos se encuentra desdoblada (5-6) como si se tratara de una

mezcla de dos proteínas. La banda 7 es la más ancha en todas las formas, se manifiesta fuertemente concentrada en un 18 % de los ejemplares analizados y siempre aparece netamente determinada. Las bandas 8-9 se resuelven también como desdoblamiento de dos proteínas, pero sólo en un



Bandas electroforéticas de seroproteínas de *Bufo arenarum*, Mendoza. (Electroforesis en gel de poliacrilamida). Variaciones intraespecíficas.

11 % se presenta como de moderada concentración; en los otros casos aparece con igual velocidad de corrimiento pero con una intensidad de coloración mucho menor.

Queda finalmente el grupo constituido por las bandas 10-11-12 que junto con el primer grupo citado representa la componente común de los

patrones. Las bandas 10-11 se presentan muy unidas y con intensidad mediana. La banda 12 es sumamente angosta y se presenta con iguales características en cada una de las cuatro formas; por lo tanto, las variaciones observadas en los 4 patrones se encuentran en el 2do. grupo que corresponde al área de las bandas 5-9 (figura 2).

DISCUSIÓN

La electroforesis en papel, evidenció en *Bufo arenarum* 4 bandas que aparecen con características netas. La gran resolución del gel de poliacrilamida, permitió la separación e identificación de 12 bandas de proteínas que determinan 4 patrones diferentes.

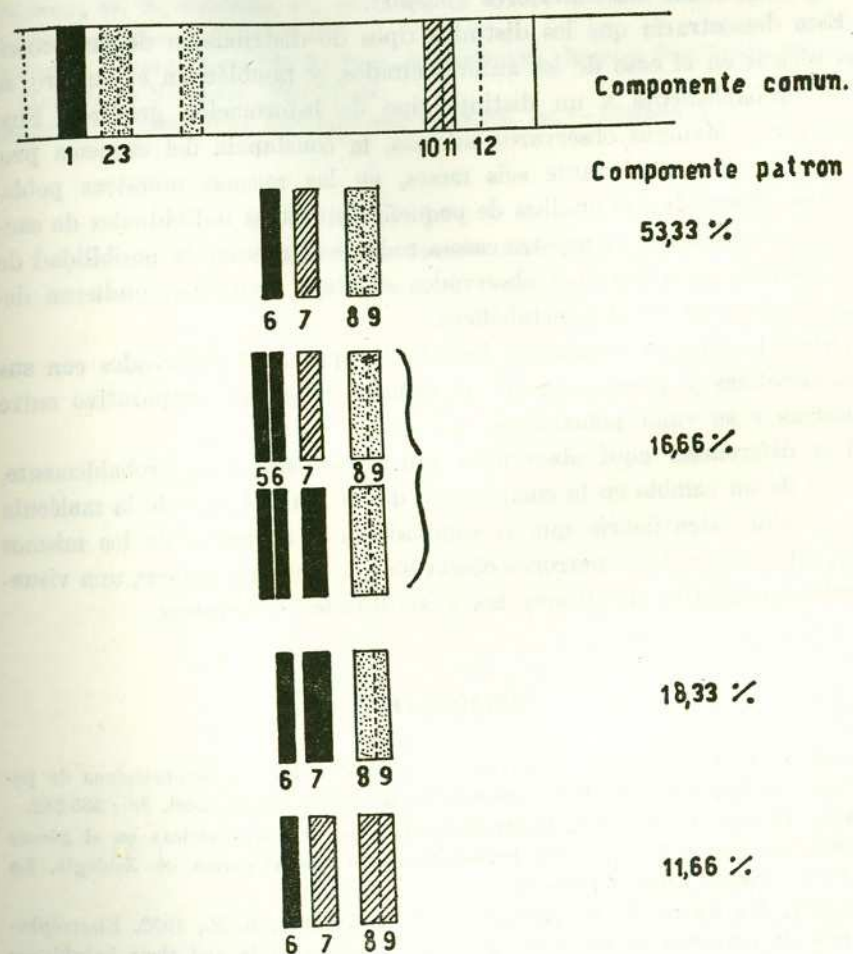
Las fracciones de movilidad más rápidas (2-3 y 4) y las de menor movilidad (10-11 y 12), son comunes en todos los observados; el área correspondiente a las de movilidad media es la que revela la diferencia de estos patrones, diferencia que se manifiesta en la intensidad y desdoblamiento de las bandas. Cabe señalar que no hay correlación alguna entre patrón proteínico y sexo del animal, a pesar de que en las hembras hay mayor porcentaje del patrón del 1er. grupo.

Fox, Dessauer y Maumus (1961) hicieron el estudio comparativo de las proteínas séricas y hemoglobinas de *Bufo valliceps*, *Bufo fowleri* y sus híbridos usando como soporte el gel de almidón. Al igual que en nuestro caso, el método por ellos usado permitió la identificación de 12 bandas que se resolvieron de distinta manera en cada una de las especies estudiadas. En el caso de las observaciones realizadas por estos autores, los patrones de las bandas 6-12 resultaron los más claramente resueltos y los de más aplicación para distinguir los ejemplares entre ellos; en nuestro caso, puede afirmarse que las áreas pueden, en cierta manera, superponerse con las por ellos señaladas pues entre las bandas 5-9 se encuentra el área útil para diferenciar los patrones intrapoblacionales.

No existe duda, que el método aquí utilizado, del gel de poliacrilamida, al igual que el del gel de almidón usado por los autores anteriormente citados, ha permitido mediante la gran resolución de fracciones, establecer diferencias interespecíficas e individuales en los materiales estudiados, diferencias que por el método del papel sólo se manifiestan como de diferente intensidad en la coloración de las bandas. No dejan duda tampoco los resultados obtenidos acerca del valor taxogenético de estas bandas; Fox, Dessauer y Maumus lo confirman. Demostraron que los patrones electroforéticos del híbrido (entre *Bufo fowleri* y *Bufo valli-*

ceps) eran una reunión de los patrones individuales de cada uno de los progenitores.

Significado parecido tienen los hallazgos de Brown en 1964 en *Bufo americanus*, *Bufo woodhousei* y sus híbridos. La técnica empleada —



Variaciones intraespecíficas en las bandas 5-9 de patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida, de *Bufo arenarum* (Mendoza). Porcentaje de frecuencia intrapoblacional.

electroforesis en papel— no permitía una fácil distinción entre ambas especies y el híbrido (todos caracterizados por 9 bandas), pero, se observa un polimorfismo en las bandas 2-5 común a ambas especies, de acuerdo a su estricta afinidad sistemática.

Observaciones análogas hicieron Horsfall y Smithies (1958) sobre las β globulinas de aborígenes de Australia; resultados de sus observaciones por métodos de electroforesis bidimensional evidenciaron que al estado homocigota estas globulinas se manifestaban cada una con un patrón específico ($\beta c/\beta c$ y $\beta d/\beta d$) y en los heterocigotas el patrón era la reunión de los dos anteriores ($\beta c/\beta d$).

Esto demostraría que los distintos tipos de distribución de las proteínas séricas en el caso de los autores citados, y también en el nuestro, se debe probablemente a un distinto tipo de información genética. Fox, Dessauer y Maumus observaron además, la constancia del esquema proteínico, repitiendo durante seis meses, en las mismas muestras poblacionales observadas, el análisis de pequeñas muestras individuales de sangre; esto contribuye en nuestro caso a reducir al mínimo la posibilidad de que los diferentes patrones observados en *Bufo arenarum*, pudieran deberse a distintos estados metabólicos.

Deben tenerse en cuenta los distintos grupos aquí observados con sus características y porcentajes, en el estudio del valor comparativo entre muestras y su valor poblacional.

Las diferencias aquí observadas pueden considerarse probablemente, reflejo de un cambio en la composición de los aminoácidos de la molécula de proteína; significaría que la composición y secuencia de los mismos sería diferente en los 4 patrones observados, lo que proporciona una visualización cualitativa de diferencias y similitudes fenotípicas.

BIBLIOGRAFIA

- BERTINI, F., CEI, J. M., 1960. Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de *Bufo arenarum*.—Rev. Soc. argent. Biol. 36 : 355-362.
- BERTINI, F., CEI, J. M., 1959. Electroferogramas de proteínas séricas en el género *Bufo*.— Actas Trabajos del Primer Congreso Sudamericano de Zoología. La Plata. Buenos Aires, 4 : 161-167.
- BRANDT, L. W., SMITH, H. D., ANDREW, A. C., and CLEGG, R. E., 1952. Electrophoretic Investigation of the serum proteins of certain birds and their hybrids.— Arch. Biochem. 36 : 11-17.
- BROWN, L. E. 1964. An Electrophoretic Study of Variation in the blood protein of the toads. *Bufo americanus* and *Bufo woodhousei*.— Syst. Zool. 4 : 92-95.
- CEI, J. M., 1959. Ecological and physiological observations on polymorphic populations of the toad *Bufo arenarum* Hensel from Argentina.— Evolution 13 : 532-536.
- COHEN DE HUNAU, R., 1965. Electroforesis en gel de poliacrilamida e interpretación de patrones seroproteínicos específicos (En prensa. Actas Trabajos III Congreso Latinoamericano de Zoología. Santiago de Chile).

- CHANG, L. O., SRB, A. M., and STENARD, F. C., 1962. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*.— Nature Lond. 193 : 756-759.
- DESSAUER, H. C., and FOX W., 1956. Characteristic electrophoretic pattern of plasma proteins of orders of Amphibia and Reptilia.— Science, 124 : 225-226.
- FOX, W., DESSAUER, H. C. and MAUMUS, L. T., 1961. Electrophoretic studies of blood proteins of two species of toads and their natural hybrid.— Comp. Biochem. Physiol. 3 : 52-63.
- HORSFALL, W. R., SMITHIES, O., 1958. Genetic control of some human serum globulins.— Science, 128 : 3314-35.
- ORUSTEIN, L., and DAVIS, B. S., Disc electrophoresis. Reprint Destillation Products Industries. Rochester. New York.
- SMITHIES, O., 1959. Zone electrophoresis in starch gel.— Biochem J. 61 : 629.

Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, U. N. Cuyo.