

ENSAYOS PRELIMINARES CON TECNICAS DE PRECIPITINAS POR
DIFUSION EN GEL DE AGAR SOBRE AFINIDADES PROTEINICAS EN
EL GENERO *PROSOPIS*

R. J. V. G. .

SUMMARY

Immunological tests by Agar-difstion (Oudin's Method), have been applied to the serological relatioJJships l.ietween some Argentine species elonging to the *Prosopis* gens of Mimosoideae. Tbe comparison between the results obtamed by gel-diffusion and other analogons tests by the precipitin technique and Photronreflectometric evalnat,iou, can support under a nonmorphological way the general arrangement of the *Prosopis* group by Burkart. Thns the proposocl *Algarobia* section to which *Prosopis caldcnia*, *fleaouosa*, *chilnsis* anud *alpataco* belong can be easily idetified by onr serological tests, but a special position may Lo stressedfor the striking morphologically aberrant *P. sericantha*. A section *strombocarpa* may be also snupported by serological distances of *P. stromblifera* and *P. torquata*, moreover a section *Moniliarpa* for the *I. argentina* such as suggested by Ruiz Leal's report, could be accepted in order to its serological relationships with the above mentioned species.

Our prelirniuary results point out again the general agreement lJetween the -physiological or analytical methods and the real assumptions of the morphological taxonomy.

La difusión en gel de agar se basa en los principios de la difusión molecular, independiente de las fuerzas gravitacionales. Las reacciones homoheterólogos de precipitinas pueden medirse con más exactitud que en los tes,ts de zona y traducirse en comparaciones directas de curvas integradas, mediante el fotronreflectómetro

de Libby, que registra en unidades galvanométricas, mediante células fotoelétricas, los sistemas precipitados, que por su estructura macromolecular, funcionan como centro de reflexión, o "scattering", de un haz de luz constante.

La difusión en gel de agar presenta la ventaja de una discriminación de los sistemas de antígenos intervinientes, de acuerdo con] a cantidad de precipitinas comunes, determinada por la especificidad de los mismos, su estructura molecular .caracterí.stica y la concentración de antígenos y anticuerpos. La técnica de difusión en columna, o de OUpr, presenta varios procesos, en especial el de difusión simple, donde el antígeno actúa en contac,to directo con la mezcla de agar y antisuero, y el de doble difusión, que también ose realiza en tubos de limitado diámetro (interior, 2 mm; exterior,

4 mm) marcados a oportunas distancias, que determinan tres regiones: una inferior, donde se coloca, la mezcla de agar en general (0,6 %) y antisuero, una intermedia de agar puro (0,3 %), denominada *arena* (de 5 ó 10 mm) y una superior que contiene el antígeno. La migración de los antígenos y anticuerpos determina luego, en relación con su coeficiente de difusión (temperatura, estructura molecular, concentraciones relativas, etc.), bandas de precipitinas en las arenas, características de cada reacción homoheteróloga y medidas por su corrimiento relativo. Este se indica

por la fórmula $P = \frac{x}{y}$ siendo x la distancia de la banda desde

el menisco superior e y y la extensión total de la arena. El significado de la densidad óptica y corrimiento de las bandas es evidente. Si la concentración de los antígenos es mayor que la de los anticuerpos, mayor es su penetración en el mismo intervalo de tiempo, aumentando el valor de P ; a la inversa cuando mayor es la concentración de los anticuerpos. Este principio se aplica a todos los sistemas en juego; variando la concentración de antígeno varía el P característico de cada sistema, o, mejor dicho, de cada componente de un sistema.

La afinidad y concentración de antígenos comunes en el mismo

sistema determina la reacción de precipitación común y su densidad óptica. Las bandas se miden por turbidimetría, por absorción de un haz de luz constante. Existen aparatos, como el *Agar Measuring Analyzer* (SAMA) o el *Serum Agar Measuring Integrator* (SAMI), ideados por GLENN (%), con los cuales hemos trabajado, que se sirven de un motor sincrónico desplazando a velocidad constante el tubo de la columna de agar frente a una ventanilla atravesada por el haz de luz. La célula fotoeléctrica registra las variaciones luminosas según la absorción de las bandas, midiéndolas por vía galvanométrica o directamente por un registrador. Las curvas características obtenidas indican los P y la densidad óptica, dada, por la altura y forma de las curvas, expresada por el valor angular θ , o de tangente, otro elemento importante para establecer la identidad de sistemas homoheterólogos.

El análisis de los antígenos en un estudio de afinidades serológicas o proteínicas entre varios *taxa* resulta muy complejo si los *taxa* considerados son muchos. En efecto, hay que operar con diluciones progresivas de antígenos, las que provocan, según sus concentraciones relativas, la aparición y desaparición de bandas correspondientes a fracciones de un determinado sistema. Por ejemplo, puede ocurrir que una banda de $P = 0.10$, diluyendo el antígeno no pueda ni siquiera penetrar más en la arena, por exceso de anticuerpos, precipitando en la zona interfacial (*interface*). Otro factor importante es la reacción individual del dador de anticuerpos (generalmente el conejo). Debieran utilizarse varios sueros inmunes, considerando estadísticamente los resultados. A veces es, prácticamente imposible, según el material objeto del trabajo.

Considerando el interés de estos métodos en biosistemática, pero aún sin aspectos crítico, y sus dificultades técnicas, hemos intentado aplicarlos, como ensayo preliminar, a algún problema local de sistemática o filogenia. En literatura no hay antecedentes abundantes: observaciones sobre Ungulados de MARABLE y GLENN (8), y sobre Escorpiones de GLENN, KEEGAN y WHITTEMORE (7).

Hemos utilizado las proteínas vegetales de las semillas de *Prosopis*, por extracción en NaCl al 2,5 % en frío, precipitación con Sulfato de Amonio al 30 % y diálisis. Previa proteinometría se inyectó la misma cantidad de proteínas a los conejos, dos para cada especie utilizada, reforzando el efecto con coadyuvantes. Después de una semana de inyecciones, día por medio, y una de espera, se realizó un test de prueba, seguido por una inyección de "shock", a la cual, luego de otra semana, y relativo test de prueba, sucedió la sangría total.

El problema que se quiso considerar fue fundamentalmente el siguiente: La clasificación morfológica de BURKART ¹⁾ coloca a las especies de *Prosopis*, algarrobos y afines, en varias secciones, de las cuales existen en la Argentina: *Cavnicarpa*, *Lomentaria*, *Strombocarpa* y *Algarobia*. RUIZ LEAL, por comunicación personal, nos hizo presente la oportunidad de otra sección, *Monilicarpa*, para una especie de este país: *Prosopis argentina*.

Aquí se investigaron en la sección *Algarobia*: *P. chilensis*, *P. caldenia*, *P. flexuosa*, *P. alpataco*, *P. sericantha*; en la sección *Strombocarpa*: *P. strombulifera*, *P. torquata*; más la problemática *P. argentina* y una *Acacia* como comparación con otro género del mismo *phyum*.

En *Algarobia*, mientras *P. chilensis*, *P. flexuosa*, *P. caldenia*, *P. cl pataco* son plantas de porte arbóreo, con caracteres comunes, muy extraña y aberrante es *.sericantha*, arbusto achaparrado, de espinas multinodales, que probablemente se aparta, como grupo especializado de esta sección. Igualmente, en *Stromhocarpa* hay poca afinidad entre *torquata*, verdadero árbol, y el común "retortuño" de las zonas halófitas del oeste (*P. strombulifera*). Los resultados de numerosos tests, por doble difusión en columna, nos han confirmado los grandes rasgos de la clasificación de BURKART (1) y asimismo la tesis de RUIZ LEAL, para *Prosopis argentina*.

Tests homo-heterólogos con antígeno 1 :0 y antisuero 1:0.5. en agar 0,6 %, pusieron en evidencia un complejo antígeno fundamental, probablemente propio de las mimosoideas. porque también se observa en *Acacia*. Este complejo comprende tres grupos de bandas de P: 0.40, 0.60 y 0.80, respectivamente. más antígenos, evidentemente en defecto, que pueden precipitar en "interface", encontrándose, por ejemplo, con sorprendente claridad en las reacciones homólogas de *P. argentina*, *P. flexuosa* y *Acacia*. Se debe tener en cuenta que, según el límite de tolerancia aceptado, las diferencias de P de homo-heterólogos, representan un buen grado de probabilidad sólo en el caso de ser mayores de 0.042 ($P \ll 0.05$).

La disociación del sistema de $P = 0,40$, característica de *Acacia*, aumentando la duración de la difusión, también aparece en *P. fleauosa*. En *Acacia* hay una banda de 0,78 con gran tendencia migratoria a las 48 y 72 horas, la que se nota también en *P. caldeni* y *P. flexuosa*. Las reacciones heterólogas entre *P. flexuosa*, *P. caldenia*, *P. chilensis* y *P. alpataco* son siempre muy fuertes, con sistemas definidos. Entre *P. alpataco* y *P. chilensis* las reacciones homo-heterólogas son idénticas, pero *P. sericantha* forma con los otros *Algarobia* precipitinas débiles e irregulares. Por las tablas I, II y III, la hase antigénica común de los *Algarobia* de BURKART se destaca, aún limitándonos al análisis de los corrimientos sin dilución de antígeno, y se puede subrayar la mayor distancia existente entre las proteínas de *P. sericantha* y las proteínas análogas de las otras especies. Los mismos tests no sustentan afinidades especiales de *Prosopis argentina* con los *Algarobia*, reaccionando, el suero anti-argentina indistinta y aproximadamente con la misma intensidad con todos los antígenos de *Prosopis* ensayados, menos *P. torquata*. En *Strombocarpa* se observa que los sistemas, que prevalecen, siempre utilizando antígenos no diluidos, son los de corrimiento 0,60, y ésta podría quizás considerarse como característica del grupo. Entre *P. torquata* y *P. strombulifera* hay escasa afinidad de sistemas de precipitinas. (Tabla IV).

TABLA 1

		Valor de P.	difusión		
Anti-caldenia X caldenia		0,61	0,81		
(A. P. 5)					
flexuosa		0,60	0,81	IF	
chilensis		0,62	0,80		
alpataco	0,32		0,80		
sericantha.....		0,60			
argentina.....		0,60		IF	
strombulifera...					
torquata					
Acacia					
Anti-flexuosa X flexuosa	0,7)	0,40	0,60	0,80	IF
(A. P. 8)					
caldenia		0,50-0,52	0,76		
chilensis.....		0,40		IF	
alpataco	0,22	0,40			
sericantha					
argentina.....		0,38	0,60	0,80	IF
strombulifera...		0,40			
torquata.....					
Acacia		0,60	0,80	IF	

IF : interface.

TABLA 11

	Valor de P. difusión		
<i>Anti-chilensis X ohilensis</i>	0,57-0,59		JF
(A. P.9)			
<i>a/pataco</i>	0,56-0,58		
<i>fleruesa..caldeia...</i> ...		0,86 1,20	
<i>serioantlrn</i>		0,90	
<i>argentina</i>	0,42		
<i>strombulifera</i>			IF
<i>/orqnala</i>			
Acacia			IF
<i>Anti- alpalaco X a/pataco</i>			
(A. P. 11)	0,32		
<i>chilensio</i>			IF
<i>flexuosa</i>	0,36	0,76-0,83	
<i>caldeIIia</i>	0,60	(@)	
<i>Sericantha</i>			
<i>argentina</i> ...	0,68		
<i>strombulifera</i> ...	0,60-0,66		
<i>torqnata</i>		0,76	
Acacia			1 F

IF: interface.

TABLA III

		Valor de P. división		
<i>Anti - sericantha X sericantha.....</i>				IF
(A.P.1)				
<i>flexuosa</i>	0,36 (&)			IF
<i>caldenia</i>		0,60		IF
<i>chilensis</i>	0,40			
<i>alpataco</i>	0,39			
<i>argentina</i>				
<i>strombulifera..</i>		0,60		
<i>torquata</i>				IF
<i>Acacia</i>				
		0,60	0,80@)	
<i>Anti-sericantha X selicantha</i>				
(A. P. 2)				
<i>flexuosa</i>		0,42-0,44		
<i>caldenia</i>		0,60	0,80	IE
<i>chilensis</i>	0,44		0,80	
<i>alpatao</i>	0,44			
<i>argentina</i>				IF
<i>stl'Ormbulifera ..</i>		0,60		
<i>torquata</i>				IF
<i>Acacia</i>				

IF: interface.

TABLA IV

	Valor de P. difusión		
<i>Anti-argentina X argentina</i> (A. P. 18)	0,40	0,60	0,80
<i>caldenia</i>	0,58-0,60		0,84
<i>flexuosa</i>	0,60		0,80
<i>chilensis</i> :	0,60		0,80
<i>alpataco</i> :.....	0,55-0,59		
<i>sericantha</i>	0,60 (%)		
<i>strombulifera</i> ...	0,40	0,60	0,72
<i>torquata</i>			
<i>Acacia</i>			
 <i>Anti-strombulifera X strombulifera</i> (A. P. 4)		0,60	
<i>caldenia</i>	0,54		0,80
<i>flecuo8a</i> :.....	0,54-0,56	0,80-1,14	IF
<i>chilensis</i>	0,58		
<i>alpataco</i>	0,52-0,53		
<i>sericantha</i> ..			IF
<i>argentina</i>	0,40	0,58	0,80 IF
<i>torqnata</i>			0,66-0,70 IF
<i>Acacia</i>			

JF: interface.

TABLA V

	Densidad óptica	P
<i>Suero anti-chilensis X chilensis</i>	8,50	0,28
(A. P. 10)		
<i>alpataco</i>	7,97	0,42
<i>caldenia</i>	8,00	0,44
<i>flexuosa</i>	7,55	0,12
.....	1,00	0,20
.....	1,20	0,70
<i>Sericantha</i>		
<i>strombulifera</i> ...	1,00	0,30
.....	2,00	0,12
<i>torquata</i>	2,00	0,80
<i>argentina</i>	2,10	0,80
<i>Acacia</i>	2,00	0,40
.....	1,50	0,72

TABLA VI

Suero anti-alpatao X alpatao	Densidad óptica	P
(A. P. 12)	3,93	0,70
<i>chilensis</i>	3,30	0,56
<i>caldenia</i>	3,33	0,56
<i>fiexnosa</i>	3,25	0,52
<i>sericantha</i>	0,75	0,36
<i>Strombulifera</i> ...	0,75	0,35

TABLA VII

Tests de absorción: antisueros homólogos+ antígeno heterólogo (a las 72 horas)

Test: antígeno *alpataco* X suero anti-*a/pataco* (AP-11) al.Jsori.Jido con antígeno *chilensis*

	D. O.	P
<i>alpataco</i> X anti- <i>a/pataco</i> + agar		
<i>alpataco</i> X anti- <i>a/pataco chilensis</i> (.1) + agar	3,0	0,5
<i>alpataco</i> X anti- <i>alpataco</i> + <i>chilensis</i> (.2) + agar	5	0
	2,2	0,8
	Absorción total	
	4	
Control (con suero normal de conejo):		
<i>alpataco</i> X anti- <i>alpataco</i> 4 control (.1) + agar.... <i>alpataco</i> X anti- <i>alpataco</i> + control (.2) + agar	2,7	0,5
	5	4
	2,20	0,5
Test: antígeno <i>alpataco</i> X suero anti- <i>alpataco</i> (AP-12) al.Jsori.Jido con antígeno <i>chilensis</i>		2
		P
<i>alpataco</i> X anti- <i>alpataco</i> + agar		0,60
<i>alpataco</i> X anti- <i>alpataco</i> + <i>chilensis</i> (.1) + agar		0,8
<i>alpataco</i> X anti- <i>a/pataco</i> + <i>chilensis</i> (.2) + agar....		0
		Absorción total
		0,6
Control (con suero normal ele conejo):		
<i>alpntaco</i> X anti- <i>alpataco</i> + control (.1) + agar		4
<i>alpntaco</i> X anti- <i>alpataco</i> + control (.2) + agar		0,62

[En todos la misma cantidad ele antisnero (0,4)].

Las medidas de densidad óptica (D.O.), dieron resultados en pleno acuerdo con los de la evaluación de P en homo-heterólogos. La tabla V indica sus valores para las reacciones de un suero antichilensis (AP-10) con otras especies. Es evidente, la afinidad de los sistemas de *Algarobia*, la ausencia de precipitinas con *P. sericantha*, y las variaciones sensibles ele los valores de densid.acl óptic.a en las reacciones heterólogas entre *P. chlensis* y las especies de los otros grupos. En la tabla VI, referida a un suero *anti-alpataco* (EP-12) presentamos otro ejemplo evidente de como D.O. y valor ele **P** sirven para caracterizar afinidades sistemáticas ele las precipitinas.

TABLA VIII

Tests de absorción: antisueros homólogos+ antígeno heterólogo (a las 72 horas)

Test: antígeno *alpataco* X suero *anti-alpataco* (AP-12) absorbido con antígeno *sericantha*

	D. O.	P
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + :igar		0,6
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + <i>sericantha</i> (.1) + agar....		0
<i>anti-alpataco</i> + <i>sericatha</i> () - agar....		0,6
		0
		0,80
Control (con suero normal de conejo):	Absorción parcial	
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + control (.1) + agar .		0,64
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + control (.2) + agar .		0,62

Test: antígeno *alpataco* X suero *anti-alpataco* (AP-12) absorbido con antígeno *argentina*

	D. O.	P
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + agar.		0,60
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + <i>argentina</i> (.1) + agar....		0,80
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + <i>argentina</i> (.2) + agar....		0,84
	Absorción parcial	
Control (con suero normal de conejo):		
<i>a/pataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + control (.1) + agar		0,6
<i>alpataco</i> X <i>anti-alpataco</i> + control (.2) + agar		4
		0,6
		2

[En todos la misma cantidad de antisuero (0,4)].

TABLA IX

Tests de absorción: antisueros homólogos + antígeno heterólogo (a las 72 horas)

Test: antígeno *strombulifera* -4 suero *anti-strombulifera* (AP-4) absorbido con antígeno *torquata*

	D. O.	p	
<i>strombulifera</i> X <i>anti-strombulifera</i> + agar	12,00	0,60	5, 1446
<i>strombulifera</i> X <i>anti-torquata</i> (O, 1) + agar	11,50	0,60	4,5107
<i>strombulifera</i> X <i>anti-torquata</i> (0,2) + agar.....	11,75	0,60	5,1446

Absorción nula

Control (con suero normal de conejo):

strombulifera X *anti-strombulifera* + control (0,1) + agar 12,15 0, 60 5, 2675 *strombulifera* X
anti-strombulifera + control (0,2) + agar 11,25 0, 60 5, 2257

[Eu todos la misma cantidad de antisero (0,4)].

TABLA X

Porcentaje de áreas homo-heterólogas en los tests de precipitinas (en Unidades fotonreflectométricas: • Photroner • de Libby), 1)

Sueros <i>anti-caldenia</i> AP-5	X <i>caldenia</i>	100 %/
	<i>chilensis</i>	89,8
	<i>flexuosa</i>	85,5
	<i>alpatao</i>	71,4
	<i>torquata</i> , .	69,5
	<i>Acacia</i>	65,2
	<i>sericantha</i>	59,4
	<i>strombulifera</i> ...	52,1
	<i>argentina</i>	33,3
<i>anti-alpatao</i> AP-11	X <i>alpatao</i>	100 /,
	<i>flexuosa</i>•	79,7
	<i>caldenia</i>	73,9
	<i>sericantha</i>	56,5
<i>anti-alpatao</i> AP-12	X <i>alpatao</i>	100 -/,
	<i>flexuosa</i>•	78,0
	<i>caldenia</i>	70,0
<i>anti-flexuosa</i> AP-7	X <i>flexuosa</i>	100 /,
	<i>caldenia</i>	83,3
	<i>chilensis</i>	77,3
	<i>sericantha</i>	70,2

TABLA XI

Porcentaje de áreas homo-heterólogas en los tests de precipitinas (en Unidades fotorelectométricas: • Photroner « de Libby). 11)

Sueros anti-serioantha X serioantha	100 /
AP-1 flexuosa	86,9
strombulifera...	82,6
oaldenia.....	61,9
alpataco.	52,1
anti-serioantha X aelicantha	100 /
AP-2 strombulifera...	82,6
anti-torquata X torquata.....	100 %/
AP-19 strombulifera	60,4
anti-strombulifera X strombulifera	100 /
AP-3 argentina	55,3
torquata	53,1
anti-strombulifera X strombulifera...	100 %/
AP-4 oaldenia	88,0
ohilensis	83,0
serioantha	79,1
argentina	54,1
torquata.....	47,9
Acacia	39,5

TABLA XII

Porcentaje de áreas homo-heterólogas en los tests de precipitinas (en Unidades fotorelectométricas: • Photroner de Libby). 111)

Sueros anti-argentina X argentina	100 /
AP-18 torquata	84,0
strombulijera	82,0
alpataco	66,6
flexuosa	66,6
oaldenia	53,8
ohilensis	41,0
serioantha	35,8

En otra serie de tests se ha aplicado la técnica de absorción parcial, con adición progresiva de antígenos heterólogos al suero que se desea absorber para la reacción homóloga, en base a las relaciones proporcionales de los antígenos comunes en las reacciones recíprocas. Consecuencias de la absorción serán, en efecto, variaciones de los valores de P y de densidad óptica, alterándose las concentraciones relativas antígeno-antisuero. Algunos de los resultados se exponen en las tablas VII y VIII. En las pruebas de absorción de sueros *anti-alpataco* con antígeno *chilensis*, y *antichilensis* con antígeno *alpataco*, la absorción es rápida e intensa, hasta la desaparición de la banda con la adición de 0,2 de antígeno. Sueros *anti-alpataco* tratados con antígeno *sericantha* o *argentina*, o sueros *anti-strombulífera* tratados con antígeno *chilensis*, revelan absorción mucho más limitada. La absorción es nula con un suero *anti-strombulífera* tratado con antígeno *torquata*, o con sueros *anti-sericantha* tratados con antígenos *chilensis* o *alpataco* (Tabla IX).

Por último se controlaron los datos de la técnica de difusión con algunos, tests fotoneflectométricos. Como demuestran las tablas X, XI y XII el significado de estos resultados no se aleja de las conclusiones generales por la difusión en gel. Los grandes, *Algarobia* revelan los más altos porcentajes de áreas homólogas, siempre arriba del 70 %; *sericantha* confirma su posición peculiar, con porcentajes de áreas inferiores, entre 56 y 70 %; los porcentajes de *strombulífera* y *argentina* con *Algarobia* son aún más bajos, hasta 33,3 % para esta última. Los sueros *anti-sericantha* acentúan la posición aberrante de este *Prosopis*: elevado porcentaje de áreas con *strombulífera* (repetido con dos distintos antisueros), valores irregulares con los demás *Algarobia*.

El test de *anti-argentina* vuelve, en fin, a refrendar la tesis de Rurz LEAL sobre una supuesta independencia taxo-genética de este *Prosopis* aislado: cierta relación con los *Strombocarpa*, poco sustentada por los porcentajes recíprocos de los sueros *anti-strombulífera*, y escasa afinidad con todos los *Algarobia*.

Los resultados de nuestros ensayos inmunológicos preliminares en *Prosopis*, aquí brevemente expuestos, demuestran una vez más el paralelismo entre los aportes concretos de la morfología sobre bases comparativas y los hallazgos de los métodos no morfológicos entre la sistemática clásica y una sistemática que bien podría definirse "sistemática molecular".

BIBLIOGRAFIA

1. BUNKART, A., *Darwiniana* 3, 1, 27-48 (1937).
2. *Darwiniana* 4, 1, 57-128 (1940).
3. *Las leguminosas argentinas-silvestres y cultivadas*, Ed. Acme Agency, 2 ed. (1952).
4. GLENN, W. G., *School Aviat. Mecl. U.S.A.F. Rep.*, 56-83 (1956).
5. *Serol. Ins. Bull.*, 18, 1 (1957).
6. *Science* 135, 434-435 (1962).
7. GLENN, W. G.; KEEGAN, H. L.; WHITTEMOR, F. W., *Science* 135, 434 (1962).
8. ARABLE, I. W.; GLENN, W. G.; *Ist. Conf. Taro. Bioch. Physiol. Serol.*, Kansas (Abstracts) 44 (1962).
9. OUDIN, L., *Methods in Medical Research* 5, New York, The Year Book Publ. Inc. (1952).
10. *An. Ist. Paster* 89, 531 (1955).

Instituto de Biología Animal
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Cuyo

(Trabajo entregado en Reclamación en 1965).