

00361

120y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

*ESTUDIO CROMOSOMICO Y DE ISOENZIMAS EN TRES
POBLACIONES MEXICANAS DE RANA LEOPARDO.*

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

PRESENTA

MA. DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA

MEXICO, D.F. 1989.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	PAG
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	9
MATERIALES Y METODOS	9
RESULTADOS	20
DISCUSION	41
BIBLIOGRAFIA	50

RESUMEN

En este trabajo se describen los cariotipos y se analizan algunos aspectos de la estructura genética de tres poblaciones mexicanas de rana leopardo, pertenecientes al complejo taxonómico *Rana pipiens*, que habitan en los estados de Morelos, Sinaloa y Tlaxcala con el propósito de contribuir al conocimiento de sus relaciones filogenéticas.

En el aspecto citogenético se encontró un cariotipo diferente en cada localidad y se observó una mayor similitud entre el de Morelos y Tlaxcala; además, se obtuvo el patrón de bandas cromosómicas G en la muestra proveniente de esta última localidad.

Con respecto al análisis electroforético de las isoenzimas, se obtuvo un alto grado de similitud genética entre las tres poblaciones, confirmando así que pertenecen al mismo complejo de especies. Los valores de distancia genética sugieren que los procesos de divergencia han ejercido sus efectos, principalmente en la población de Sinaloa.

Se compararon los resultados de este trabajo con los de Frost (1982), Hillis, Frost y Wright (1983) y Hillis y Frost (1985) quienes se han dedicado al estudio sistemático de las poblaciones de rana leopardo de nuestro país en los últimos años.

I N T R O D U C C I O N

Las ranas, anfibios muy comunes en prácticamente todo nuestro país, han formado parte integral de la vida cotidiana de los mexicanos desde antes de la conquista y aún en nuestros días en algunos sectores de la población.

Se sabe que los antiguos mexicanos conocían distintas variedades de ranas que utilizaban en fiestas, rituales y actividades cotidianas de captura y alimentación.

Durante este siglo, muchos investigadores, tanto nacionales como extranjeros se han dedicado a describirlas y a realizar estudios acerca de su distribución geográfica, hábitos, etc (Rudich 1980), hecho que continúa hasta la actualidad en virtud de que se ha encontrado que constituyen un grupo de sumo interés desde el punto de vista biológico.

Una de las ranas más ampliamente distribuida, no sólo en México, sino en todo Norteamérica y parte de Centroamérica, es la rana leopardo que se encuentra comunmente en depósitos de agua y a orillas de aguas corrientes, (Rudich, 1980).

Las poblaciones de ranas leopardo varían morfológica y fisiológicamente, por lo que durante mucho tiempo hubo dudas sobre cómo debían ser consideradas taxonómicamente, hasta que Moore (1944) concluyó que las poblaciones de las riberas del Este de Norteamérica eran poblaciones alopátricas de una misma especie, Rana pipiens. Los trabajos experimentales acerca de las variaciones fisiológicas, genéticas y de desarrollo en diferentes pobla-

ciones de estos anfibios, llevados a cabo por Moore y otros investigadores hicieron de las ranas leopardo un modelo idóneo para estudios de especiación (Pace, 1974).

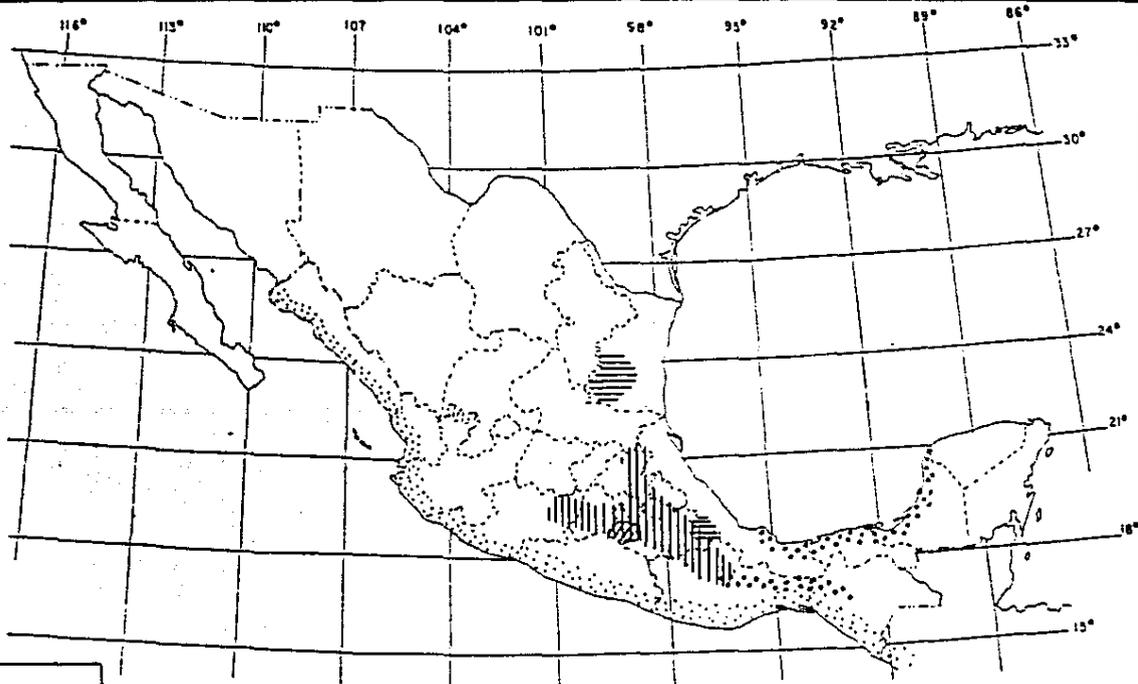
Varios autores dedicaron entonces sus esfuerzos al estudio de estos organismos en los Estados Unidos. Así, por mencionar algunas de las investigaciones realizadas, Mc Alister (1961), describió tres unidades morfológicas parapátricas que posteriormente fueron reconocidas como R. berlandieri, R. blairi y R. sphenocphala (Hillis, 1988). En 1964, Fowler propuso una hipótesis con bases genéticas para explicar las anomalías de los híbridos obtenidos experimentalmente entre poblaciones diferentes de R. pipiens y sugiere que el desarrollo de embriones normales depende de un equilibrio entre los genes del citoplasma (efecto materno) y los del núcleo del cigoto. Littlejohn y Oldham (1968), describieron la estructura del canto de cuatro poblaciones distintas de ranas leopardo y concluyeron que se trataba de cuatro especies diferentes, rechazando entonces la idea de una variación clinal. Mecham (1969), con base en los resultados de cruzas experimentales, sugirió que se considerara a R. pipiens berlandieri como una especie distinta de R. pipiens, aunque no le asignó un nombre en especial.

También se han efectuado análisis electroforéticos de hemoglobinas, como los publicados por Platz y Platz (1973), quienes apoyan la idea de que el complejo R. pipiens está constituido por varias especies y el de Case (1978) cuyos resultados le permitieron sugerir una historia evolutiva de las ranas de Norteamérica.

El caso de las poblaciones mexicanas ha sido diferente, pues no se habían realizado tantos estudios sino hasta épocas más recientes. Sanders y Smith (1971), con base en la presencia constante del melanismo ventral en las ranas leopardo de algunas localidades mexicanas, sugirieron que debían considerarse como pertenecientes a una especie diferente de la que habita en los Estados Unidos, y las incluyeron en la especie R. berlandieri. Posteriormente Sanders (1973), registró tres subespecies de R. berlandieri con la siguiente distribución: R. b. berlandieri se encuentra a lo largo de la costa del Golfo de México, desde el sur de Texas, (EUR) hasta el sur de Veracruz; R. b. brownorum se extiende desde el sur de Veracruz atraviesa el estado de Oaxaca y llega hasta Chiapas; y, finalmente, R. b. forreri cuya distribución se localiza principalmente a lo largo de la costa del Pacífico (Fig No 1) desde el sur de Sonora hasta Nicaragua. Las características morfológicas distintivas de cada subespecie son: el patrón de manchas dorsales, la forma de los pliegues dorsolaterales y la presencia de oviductos vestigiales en los machos.

En 1982, Frost con base en sus resultados y en observaciones de las cruces experimentales entre R. b. forreri y R. b. berlandieri, del análisis electroforético de las albúminas y de la estructura de los cantos, propuso que se elevara al nivel de especie a la primera de esas subespecies.

Posteriormente Hillis y Frost (1985), describieron tres nuevas especies de ranas leopardo pertenecientes al grupo R. berlandieri, distribuidas en los siguientes estados de la República: R.



R. b. forreri
R. b. berlandieri
R. b. brownorum
R. b. trilobata
R. spectabilis

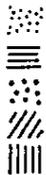


FIGURA No 1: DISTRIBUCION EN LA REPUBLICA MEXICANA DE LAS
 SUBESPECIES DE *Pano berlandieri*.
 (SANDERS Y SMITH, 1971; SANDERS, 1973; HILLIS Y
 FROST, 1985).

Dibujo: Arturo L. Roséndiz Cruz.

neovolcánica, se encuentra en Jalisco, Michoacán y Guanajuato; R. sorsciabilis en Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala y Veracruz; R. tiloloci, en el Distrito Federal y alrededores del estado de México (Fig No 1). La distinción de estas tres especies se basa en la combinación de caracteres morfológicos de adultos y renacuajos, además de varios marcadores aloenzimáticos únicos. Es evidente que estos investigadores están a favor de la idea de que el complejo R. pipiens está constituido por varias especies distintas.

Con respecto a otra clase de estudios, como los cariológicos, es un hecho ampliamente aceptado el que la morfología del cariotipo de un organismo dado es una característica del fenotipo, que es especie-específica y que evoluciona, en gran medida, independientemente del genotipo (Morescalchi, 1967 y 1973), por lo que las especies del género Rana también han sido objeto de estudio en este campo.

La mayoría de las especies del género presentan un número diploide igual a 26 cromosomas, con ligeras variaciones entre una especie y otra, consistentes en diferentes arreglos de la heterocromatina y, en ocasiones, diferencias en la posición del centrómero en los cromosomas pequeños. Se distinguen dos grupos en el complemento cromosómico de las ranas: uno que abarca cinco pares grandes (metacéntricos y submetacéntricos), y el otro que incluye a ocho pares de homólogos de menor tamaño (metacéntricos, submetacéntricos y subteloecéntricos); en el brazo largo del par 10 se localiza la región del organizador nucleolar (Morescalchi, 1973;

Hillis, 1988). Esta descripción corresponde a la de un cariotipo típico del género.

Esta estabilidad del cariotipo es aparente, pues las observaciones se han realizado a un nivel relativamente superficial, se considera únicamente el número y morfología cromosómicas; esto quiere decir que no implica, necesariamente, la ausencia de rearrreglos estructurales (Morescalchi, 1973).

Hillis (1988), apunta la necesidad de incorporar los estudios de bandedo cromosómico en el grupo, para poder determinar con mayor precisión las tendencias evolutivas de los cromosomas. En realidad si se han llevado a cabo trabajos de este tipo, sólo que los resultados han sido poco alentadores.

Schmid (1978), no logró observar el patrón de bandas Q ni de bandas G característico en ninguno de los cromosomas de las ocho especies del género Rana en las que intentó y comenta además que otros autores obtuvieron resultados similares con otras especies de Anfibios. Sin embargo, sí observó bandas G en cromosomas profásicos y propuso que la condensación extrema de los cromosomas en metafase, impide la observación de la tinción diferencial.

Posteriormente Manago et al (1980), publicaron que tras haber aplicado varios de los procedimientos existentes, lograron observar bandas G en cromosomas metafásicos de R. pipiens, aunque con la apariencia de cuentas de collar y no como bandas discretas características de los cromosomas de mamíferos.

En una revisión acerca de la tinción diferencial de cromosomas de Anfibios realizada por Birstein (1982), se analizan los

resultados obtenidos en varias especies a las que se aplicaron diferentes tratamientos para observar bandas cromosómicas Q, G y C, y sugiere que las diferencias encontradas con respecto a los mamíferos pueden ser debidas a una organización específica del ácido desoxirribonucleico (ADN) en los anfibios, a una condensación especial de los cromosomas, o ambas situaciones.

Al considerar la proposición de Mayr (1973), en el sentido de que la variación en poblaciones aisladas geográficamente es un fenómeno universal, puede suponerse que así como difieren en caracteres morfológicos también diferirán en la frecuencia de algunas proteínas en particular. La individualidad bioquímica existe, y como consecuencia de la reproducción sexual, no pueden existir dos grupos de organismos idénticos. Cada una de las poblaciones locales está sujeta a presiones de selección continuamente por lo que, si habitan en dos localidades diferentes, las pequeñas diferencias entre ellas pueden acentuarse (Gutman, 1973).

La variación genética es una condición necesaria para que ocurra la evolución y en la mayoría de las poblaciones naturales se manifiesta a través de alelos múltiples en un cierto número de loci. Una manera de cuantificar esta variación es mediante el polimorfismo (proporción de loci polimórficos en una población) y la heterocigosidad (frecuencia promedio de individuos heterocigotos en un número representativo de loci, por lo general 20 como mínimo) (Hartl, 1980; Ayala, 1984).

Las isoenzimas son formas moleculares múltiples de una enzima dada, están presentes en uno o varios individuos de la misma

especie, comparten cuando menos un sustrato en común y han resultado ser excelentes indicadores de la variabilidad genética en un grupo de organismos. Entre las ventajas de estas moléculas como marcadores genéticos se encuentran: el análisis puede efectuarse en gran número de individuos pues se requieren pequeños volúmenes de muestra de tejido; las isoenzimas alélicas (aloenzimas), se expresan de manera codominante, es decir, ambos alelos se manifiestan fenotípicamente en los heterocigotos; y además pueden variar en los diferentes tejidos (tejido-específicas) y en diferentes etapas del ciclo de vida de los organismos (Brewer, 1970; Harris y Hopkinson, 1976; Rider, 1980).

Hillis et al (1983), publicaron los resultados que obtuvieron del análisis de las isoenzimas de 23 especies del complejo R. pipiens, 16 de las cuales habitan en nuestro país, e incluyeron muestras de R. ferreri y ejemplares del área de distribución de las subespecies brownorum y irlobata de R. herlandieri en ese estudio. La conclusión a la que llegaron es que existen dos grandes grupos simpátricos, División Alfa y División Beta, dentro de los que se incluyen los grupos de especies R. montezumae y R. arcuata y los grupos R. pipiens y R. herlandieri, respectivamente.

El trabajo que a continuación se presenta fue iniciado hace aproximadamente 10 años y, como puede inferirse de lo expresado anteriormente, durante este tiempo los conocimientos en torno al complejo R. pipiens se han incrementado y las ideas han cambiado. Sin embargo, quedan aún muchos aspectos por dilucidar principal-

mente en las poblaciones que habitan en la República Mexicana, en virtud de la amplia gama de interacciones organismos - medio ambiente que sus características geográficas le confieren.

El objetivo de este trabajo es el de contribuir al conocimiento de las relaciones filogenéticas que existen entre tres poblaciones mexicanas de ranas leopardo, pertenecientes al complejo taxonómico *R. pipiens*, a través del análisis de algunos aspectos de sus cromosomas y de su estructura genética.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

En esta parte se incluyen los siguientes incisos:

- A) Recolecta del material biológico
- B) Estudio citogenético
- C) Aspecto bioquímico.

A) RECOLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se recolectaron especímenes de diferentes edades y sexo, entre 1979 y 1988 interrumpidamente, en algunas localidades de los estados de Morelos, Sinaloa y Tlaxcala (Fig No 2).

a) CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS DE LOS LUGARES DE COLECTA

Del estado de Morelos, los organismos se obtuvieron en los alrededores de la Laguna del Rodeo y de Xiutepec, (Fig No 3).

Estas localidades se encuentran entre los 1,400 y 1,500 metros sobre el nivel del mar, a 18° 55' de Latitud Norte y 99° 6'



FIGURA No 2:

LOCALIDADES DONDE FUERON
 RECOLECTADOS LOS EJEMPLARES
 DE ESTE ESTUDIO: "EL RODEO"
 Y XIUTEPEC, MORELOS; GUASAVE,
 SINALOA Y TECOMALUCAN,
 TLAXCALA.

Dibujo: Arturo L. Roséndiz Cruz.



FIGURA 16. 3: FIGURA "EL RODEO", MORELOS.

de Longitud Oeste.

El clima que prevalece en esa zona, de acuerdo con García (1973), es semicálido, del grupo de los cálidos, con una temperatura media en el mes más frío superior a los 18 °C y temperatura media anual entre los 18 y 22 °C. Es una región subhúmeda con régimen de lluvias en verano, con menos del 5 % de precipitación invernal. Se considera isotermal, con marcha anual de temperatura tipo Ganges y se presenta un periodo de sequía intraestival. La fórmula climática es : $R(C) w1(w) i g w''$.

Los ejemplares de Sinaloa provienen de los canales de riego situados en los alrededores de la ciudad de Guasave (Fig No 4), a 25° 34' de Latitud Norte y 108° 28' de Longitud Oeste y la altitud es de 25 msnm.

En esta localidad el clima está clasificado como árido; es cálido pues su temperatura media anual se encuentra sobre los 22 °C y la del mes más frío es superior a 18 °C. Presenta régimen de lluvias en verano, con menos del 5 % de precipitación invernal, y se considera extrenoso por presentar una oscilación térmica entre los 7 y los 14 °C. La fórmula correspondiente a este tipo de clima, de acuerdo con García (1973), es: $BSO (h') w(w) (e)$.

En Tecomalucan, lugar ubicado 10 km al Este de Tlaxco, Tlaxcala, se encuentra una pequeña poza donde se realizó la colecta, (Fig No 5). Se localiza a los 19° 37' de Latitud Norte y 98° 6' de Longitud Oeste, a una altitud de 2,900 msnm.

Las condiciones climáticas prevalecientes en esta área se incluyen en un clima de tipo templado (García, 1973), con una



FIGURA No. 4: CANALES DE RIEGO EN GUASAVE, SIMOLON.



FIGURA No. 5: TIERRA OCCHO, TIBZCALO.

temperatura media durante el mes más frío de -3°C a 18°C , y en el mes más cálido, la temperatura es superior a 6.5°C . El verano es fresco y largo, la temperatura media anual es de 12 a 18°C y la del mes más cálido menor a los 22°C ; la precipitación invernal es menor al 5 % del total anual y, al igual que en las localidades de Morelos, es isotermal, la temperatura tiene una marcha anual tipo Ganges y existe un período de sequía intraestival. En este caso, la fórmula es: $C = b(w_1)(w) + g w^n$.

En el Cuadro No 1 se presenta un resumen de estas características climatológicas.

b) METODOS DE RECOLECTA

La recolecta se realizó tanto de día como de noche; las ranas se capturaron con la ayuda de una red entomológica y se mantuvieron dentro de costales de ixtle con plantas acuáticas en su interior y así fueron transportadas al laboratorio, donde se colocaron en peceras de vidrio cubiertas con papel para evitar que la luz molestara a los animales.

Una vez que los organismos se encontraron en el laboratorio, y antes de ser sacrificados, se les asignó un número de catálogo y se registraron los datos de lugar y fecha de recolecta y algunas características morfológicas como longitud total, peso, distancia interorbital y principalmente la forma y número de las manchas dorsales, la forma de los pliegues dorsolaterales y la presencia de melanismo ventral. En los casos que fue posible se determinó el sexo.

CUADRO No 1: PRINCIPALES CARACTERISTICAS CLIMATOLOGICAS DE LAS LOCALIDADES DE COLECTA, (SEGUN GARCIA, 1973).

CARACTERISTICAS DEL CLIMA	MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
- TIPO	SEMICALIDO	ARIDO	TEMPLADO
- TEMPERATURA MEDIA ANUAL	18 a 22 °C	> 22 °C	12 a 18 °C
- PRECIPITACION ANUAL	> rh *	> rh	> rh
- PRECIPITACION/TEMPERATURA (P/T)**	42.3 a 55.3	< 22.9	43.2 a 55.0
- OSCILACION TERMICA***	< 5 °C	7 - 14 °C	< 5 °C

* rh = Cantidad minima necesaria de precipitación anual (expresada en cms), para que el clima sea húmedo o subhúmedo; si la estación cuyo clima se clasifica tiene una precipitación anual menor que rh, su clima es seco.

** P/T = Cociente de la precipitación anual en mm sobre la temperatura media anual en °C.

*** oscilación térmica = diferencia en temperatura entre el mes más frío y el más caliente.

c) IDENTIFICACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

La identificación de los especímenes capturados se realizó aplicando los criterios de Frost (1982) y Hillis y Frost (1985), por el M. en C. Oscar Flores. Así los individuos de Morelos y de Tlaxcala se consideraron pertenecientes a la especie R. specia-
bilis y los de Sinaloa a R. ferreri.

De cada una de las localidades se conservaron ejemplares que actualmente se encuentran en el Laboratorio de Genética Evolutiva de la UAM - Iztapalapa y, en fecha próxima, parte de ellos serán depositados en las colecciones del Instituto de Biología y del Museo de Zoología de la facultad de Ciencias de la UNAM.

B) ESTUDIO CITOGENÉTICO

a) OBTENCIÓN DE MATERIAL CROMOSÓMICO

La obtención de cromosomas se practicó en todas las muestras aunque no siempre se obtuvieron resultados positivos. Para la elaboración de los cariotipos e idiogramas se utilizaron 18 especímenes de Morelos (cuatro recolectados en 1979 y 14 en 1987), 22 de Sinaloa (recolectados en 1980) y 17 de Tlaxcala (recolectados en 1983, 1984 y 1987). A partir de 1984, las preparaciones fueron procesadas también para obtener bandas cromosómicas G.

Para obtener cromosomas en metafase se aplicaron dos métodos: el cultivo de linfocitos de la sangre y el de obtención de células de la médula ósea. En el primero, se aplicó la técnica descrita por Schmid (1978), con algunas modificaciones basadas en

Seto y Rounds (1965) y Cruze y Patterson (1973); en el segundo se aplicó la técnica de Tjio y Whang (1962), también con algunas modificaciones basadas en la experiencia propia. Ambas técnicas se describen a continuación:

1) CULTIVO DE LINFOCITOS

Para obtener la muestra de sangre, se anestesió al organismo, se limpió la piel de la región ventral con alcohol al 70 % ó con cloruro de benzalconio al 1 % (Terrier), se expuso el corazón previa incisión e inmediatamente después se practicó una punción cardiaca con una jeringa heparinizada (1,000 UI; Microlab).

En seguida se procedió a la siembra, la cual consistió en añadir 0.25 ml de sangre a frascos ampula de vidrio (capacidad de 60 ml) que contenían 5 ml de Medio Mc Coy 5a (Microlab) diluido con agua destilada estéril en proporción 3:2, 0.2 ml de fitohemaglutinina (Microlab) y 0.02 ml de solución antibiótica "Antibac" (Microlab). Los frascos se incubaron a temperatura ambiente durante cuatro a cinco días.

Todo lo anterior se realizó en condiciones de esterilidad para lo cual se utilizó una campana de flujo laminar (Ueco).

Cinco horas antes de iniciar la cosecha, se añadió a cada uno de los cultivos 0.125 ml de Colcemida (10 ug/ml; Microlab). Transcurrido ese tiempo, se pasaron los cultivos a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga clínica (Solbat). Se retiró el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur y se dejó un pequeño volumen del mis-

no sobre el paquete celular; éste se resuspendió y con agitación constante se agregaron 5 ml de solución de cloruro de potasio al 0.046 M (J.T. Baker); se incubaron en esta solución durante 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a la misma velocidad durante 10 minutos y nuevamente se retiró el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular y se añadió fijador recién preparado con metanol y ácido acético (Merck) en proporción 3:1, de la misma manera en que se agregó la solución hipotónica. Se hicieron varios lavados con el fijador hasta que el sobrenadante fuera incoloro.

Los preparaciones se hicieron de acuerdo con la técnica de secado a la flama; se utilizaron portaobjetos limpios y sumergidos en agua destilada fría.

2) CROMOSOMAS DE CELULAS DE LA MEDULA OSEA

A cada uno de los individuos se les inyectó una solución de colchicina (Sigma) al 0.3 %, de 6 a 12 horas antes de ser sacrificados, en una dosis de 0.1 ml/gr de peso corporal.

Se disectaron los huesos de las extremidades, (húmero, fémur y tibiofibula) y se extrajo la médula de los mismos mediante la inyección de medio McCoy 5a modificado (Microlab) diluido en agua destilada (3:2).

Una vez que se resuspendió el material con la ayuda de una pipeta Pasteur, éste se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se realizaron el tratamiento hipotónico, la fijación y las preparaciones de la misma manera descrita para los

cultivos de linfocitos.

b) DETERMINACION DEL NUMERO CROMOSOMICO

Las preparaciones obtenidas de cada individuo fueron teñidas con la técnica convencional, es decir, con el colorante de Giemsa (Merck) al 5 X en agua destilada, durante 20 minutos.

Estas preparaciones se revisaron en un microscopio óptico (Zeiss), y se registraron aquéllas figuras mitóticas de buena y excelente calidad. Se contó y anotó el número de cromosomas presentes en cada una de ellas.

En promedio se revisaron 50 mitosis por individuo de cada localidad y para cada una de ellas, se determinó el número modal de cromosomas, se consideró a éste como el número cromosómico de la especie.

c) ELABORACION DE CARIOTIPOS E IDIOGRAMAS

Una vez determinado el número cromosómico, se procedió a fotografiar las mejores mitosis de cada uno de los ejemplares procesados mediante una cámara (Zeiss) adaptable al microscopio y se usó también un fotomicroscopio Docuval (Zeiss Jena), un promedio de cinco fotografías por individuo.

Se recortó cada una de las fotografías y los cromosomas se ordenaron de mayor a menor tamaño, para elaborar así el cariotipo.

Posteriormente se midió con un vernier la longitud del brazo corto (p) y del brazo largo (q) de todos los pares de cromosomas

en cada uno de los cariotipos. Con estos datos se calculó el valor promedio, en centímetros, de la longitud total de cada brazo, la longitud total promedio de cada par de cromosomas ($p+q$), así como el valor promedio de la relación brazo largo / brazo corto (q/p).

Para obtener las longitudes relativas, se sumaron las longitudes promedio de los trece pares y el total se consideró como el 100 %; entonces se transformaron los valores absolutos a porcentajes y con ellos se elaboraron los idiogramas correspondientes a cada una de las localidades.

Todos estos cálculos se realizaron en una computadora HP150 (Hewlett Packard) y se utilizó el programa "Lotus 1-2-3".

Los cromosomas fueron clasificados de acuerdo con la posición del centrómero según el criterio propuesto por Levan *et al* (1964), para cromosomas humanos en: metacéntrico ($q/p = 1.00$ a 1.69), submetacéntrico ($q/p = 1.70$ a 2.99), subteloecéntrico o acrocéntrico ($q/p = 3.00$ a 7.00) y telocéntrico ($q/p > 7.00$).

d) BANDAS CROMOSOMICAS G

Para obtener la tinción diferencial de bandas cromosómicas G en los cromosomas de rana, fue necesario realizar numerosos intentos y modificaciones a la técnica propuesta por Wang y Fedoroff (1972) y Cerrillo (1985) que dieron como resultado la siguiente técnica:

Las preparaciones con células en mitosis se sometieron a un tratamiento con tripsina (Difco 1:250) a una concentración de

0.005 X en cloruro de sodio al 0.9 X (J.I. Baker), o bien, tripsina - verseno (Microlab) a una concentración final de 0.00125 X en cloruro de sodio al 0.9 X a una temperatura de 37 °C. La exposición a la enzima varió de 10 a 15 min. Inmediatamente después, las preparaciones se enjuagaron en solución salina (NaCl al 0.9 X) dos veces y se tificaron con colorante de Giemsa al 5 X en buffer de Sørensen a un pH de 6.8 durante 2 a 3 minutos.

Se fotografieron las mitosis de buena calidad en las que se apreciaron claramente las bandas en los cromosomas; con las impresiones en papel fotográfico, se elaboraron los cariotipos correspondientes y con ellos, se determinó el patrón de tinción diferencial de cada uno de los cromosomas.

También se tomaron diapositivas de esas mismas figuras mitóticas, las cuales fueron proyectadas y dibujadas sobre un papel, con el objeto de poder determinar con mayor precisión el número, tamaño y posición de las bandas G.

D) ISOENZIMAS

Los ejemplares utilizados para esta parte del estudio fueron en total 41: 15 de Morelos, 22 de Sinaloa y 4 de Tlaxcala; se capturaron entre 1987 y 1988.

El análisis de las isoenzimas en las muestras de las tres localidades, se llevaron a cabo mediante los procedimientos descritos por Hillis *et al* (1983), Thompson y Sites (1986) y Aguilar *et al* (1988) para la homogenización de los tejidos y la electroforesis en gel de almidón, y los de Selander *et al* (1971) y Har-

ris y Hopkinson (1976) para las tinciones histoquímicas.

A continuación, se detalla el procedimiento:

a) OBTENCION Y HOMOGENIZACION DE MUESTRAS DE TEJIDOS

Inmediatamente después de sacrificar a cada uno de los individuos, se procedió a tomar una pequeña muestra de los tejidos hepático y muscular, que fueron colocadas en criotubos (Nunc) debidamente etiquetados, y depositadas enseguida en un tanque conteniendo nitrógeno líquido para su preservación.

Los tejidos se homogenizaron en buffer Tris (Sigma) 0.1 M, con ayuda de un homogenizador eléctrico (BYU) y para evitar que la temperatura de las muestras se elevara considerablemente se les mantuvo en un baño de hielo. Se centrifugaron durante 30 minutos a 4,000 rpm en una centrifuga con refrigeración; los sobrenadantes se guardaron en criotubos limpios y se mantuvieron a - 150 °C.

b) ENZIMAS ENSAYADAS Y NOMENCLATURA

Las enzimas que se ensayaron fueron seleccionadas con base en el trabajo de evaluación bioquímica que Hillis *et al* realizaron en organismos del complejo Rana pipiens en 1983, y otras sugeridas por Sites (1986).

La nomenclatura y numeración utilizadas, siguen las normas establecidas por la "International Union of Biochemistry" y la Comisión de Enzimas (CE) (1984); la designación de las isoenzimas así como sus abreviaturas están de acuerdo con las recomendacio-

nes de Murphy y Crabtree (1985), como se observa en el Cuadro No 2.

c) ELECTROFORESIS EN GEL DE ALMIDON

El gel se preparó al diluir almidón de papa (Sigma) en buffer Tris Citrato pH 7 (IC 7) o Tris Verseno Borato pH 8 (TUB 0), de acuerdo con las características de las enzimas a resolver, y al calentar hasta ebullición por algunos minutos; se eliminaron las burbujas de aire y se vació en moldes de acrílico especialmente diseñados para ello.

Cuando hubo solidificado el gel de almidón, se procedió a dividirlo en dos, a 5 cms de uno de los extremos del molde. Entre estas dos partes se colocaron las muestras de los tejidos homogeneizados, las cuales se encontraban en fragmentos rectangulares (0.2 x 0.5 mm) de papel Whatman del No 3.

Inmediatamente después, se colocó en una charola para electroforesis que contenía en cada compartimento 400 ml del mismo buffer con el que se había preparado el gel, se incubó a 4 °C y se aplicó una corriente eléctrica de 75 mA durante 12 a 16 horas.

Las condiciones electroforéticas en que se resolvieron los diferentes loci se presentan en el Cuadro No 3.

d) TINCIONES HISTOQUIMICAS

Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, se procedió a cortar el gel en rebanadas de 1 mm de grosor, cada una de las cuales fue colocada en una charola de plástico; ahí se añe-

CUADRO No 2: ENZIMAS ANALIZADAS, NUMERO DE LA COMISION DE ENZIMAS (CE) Y DESIGNACION DE LOS LOCI DE LAS ISOENZIMAS. (International Union of Biochemistry, 1984; Murphy y Crabtree, 1985).

NOMBRE	NUMERO	LOCUS
- Aconitato hidratasa	4.2.1.3	ACON
- Adenilato cinasa	2.7.4.3	AK
- Adenosina desaminasa	3.5.4.4	ADA
- Amino peptidasa	3.4.11.1	AP
- Aspartato aminotransferasa	2.6.1.1	AAT
- Catalasa	1.11.1.6	CAT
- Creatinina cinasa	2.7.3.2	CK
- Enzima málica	1.1.1.40	ME
- Esterasa	inespecifica	EST
- Fumarasa	4.2.1.2	FUM
- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	1.1.1.49	G6PD
- Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	PGM
- Fosfogluconato 6 deshidrogenasa	1.1.1.44	PGDH
- Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12	G3PD
- Glicerol fosfato deshidrogenasa	1.1.1.8	aGPD
- β -Glucoronidasa	3.2.1.31	β GUR
- β -Glucosidasa	3.2.1.21	β GSD
- Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	IDH
- Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	LDH
- Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH
- Manosa fosfato isomerasa	5.3.1.8	MPI
- α -Manosidasa	3.2.1.24	aMAN
- Peptidasas:	3.4.11.13 ó 9	
Leucil-L-alanina		PEP-LA
L-leucil-glicil-glicina		PEP-LGG
L-leucil-L-prolina		PEP-LP
- Proteinas que se unen al calcio	inespecifica	CaBP
- Superóxido dismutasa	1.15.1.1	SOD
- Triosa fosfato isomerasa	5.3.1.1.	TFI

CUADRO No 3: CONDICIONES ELECTROFORETICAS APLICADAS, TEJIDOS UTILIZADOS Y LOCI DE LAS ENZIMAS ENSAYADAS.

TEJIDO

BUFFER

LOCUS

HIGADO	TC 7	AAT ACON EST α GPD LDH MDH ME MPI GGPD PGM SOD TPI
	TVB 8	CaBP CAT EST FUM β GUR β GSD α MAN PGDH PGM SOD
MUSCULO	TC 7	ADA AP CaBP EST G3PD IDH ME
	TVB 8	AK CK PEP (LA, LGG, LP) PGM

dieron los sustratos y reactivos adecuados para obtener la reacción enzima - sustrato (que básicamente consistió de dos pasos: una reacción de óxido - reducción y otra de acoplamiento que dió como resultado la formación de un compuesto con color), y se incubaron a 37 °C de 15 a 30 minutos.

Al aparecer las manchas coloridas en el gel, se desecharon los reactivos añadidos y se incubaron los geles en una solución fijadora preparada con ácido acético, metanol y agua corriente, en proporción 1:5:5 durante una hora. Después se desechó el fijador y se mantuvieron en agua corriente durante una hora más.

e) DETERMINACION DE GENOTIPOS

Al encontrarse el gel en el agua, se realizaron las "lecturas" de los fenotipos de cada uno de los individuos para cada uno de los loci resueltos y se infirió su genotipo de la siguiente manera: se observaba si había muestras con diferentes desplazamientos (electromorfos) y se asignaba la letra A al fenotipo más frecuente, "B" al que le seguía en frecuencia de aparición, y así sucesivamente. A estos fenotipos les correspondían los genotipos A/A, B/B, etc, o bien A/B en el caso de los heterocigotos, (cuando una misma muestra presentaba los dos electromorfos).

f) PROCESAMIENTO DE DATOS

Los genotipos registrados para cada individuo, en cada uno de los loci detectados, fueron procesados en una computadora IBM utilizando el programa BIOSYS - 1 de Swofford y Selander (1981).

Los cálculos de variabilidad genética realizados para cada una de las muestras incluyeron: frecuencias alélicas por locus, (frecuencia de individuos homocigotos para un alelo más la mitad de la frecuencia de individuos heterocigotos para el mismo alelo); número promedio de alelos por locus, (número total de alelos entre número total de loci); porcentaje de loci polimórficos, (porcentaje de loci polimórficos aplicando el criterio de 0.95); heterocigosidad promedio, (suma de la heterocigosidad en cada locus entre el número total de loci analizados); y coeficientes de similitud y distancias genéticas, (la identidad genética es la probabilidad de que un alelo tomado de dos poblaciones diferentes sea idéntico; la distancia es igual al logaritmo natural negativo del valor de la identidad genética), de Nei (1972, 1978) y Rogers (1972).

El mismo programa realizó los cálculos para aparear los coeficientes de distancia y similitud genéticas de Rogers (1972), de acuerdo con el algoritmo UPGMA de Sneath y Sokal (1971), y elaboró los dendrogramas correspondientes.

R E S U L T A D O S

A) MATERIAL BIOLÓGICO

En total se recolectaron 109 ejemplares de ranas leopardo en las tres localidades, entre 1979 y 1988.

En el estado de Morelos se capturaron un total de 33 individuos entre hembras y machos; en el estado de Sinaloa se recolec-

taron 48 ejemplares, la mayoría de ellos eran machos; del estado de Tlaxcala se obtuvieron 28 individuos; en el Cuadro No 4 se presenta, en forma resumida, el número de ejemplares recolectados en las diferentes fechas y localidades.

Se observó que la mayoría de las ranas de Morelos y de Tlaxcala presentaban manchas de forma redonda y también alargadas y se encontraron ambos tipos en un solo individuo; en los ejemplares de Sinaloa se encontró además otro tipo, el de manchas fusionadas, y en esta población se registró una gran variabilidad en este aspecto, pues se presentaron combinaciones de esas tres formas así como individuos con los tres tipos simultáneamente. En lo que a número se refiere, en las tres muestras se contaron alrededor de 20 manchas por espécimen.

Con respecto a la forma de los pliegues dorsolaterales, en todas las muestras predominan los pliegues discontinuos, aunque en la de Morelos están casi en proporción 1:1 con los continuos. Una observación interesante fue que en las muestras de Morelos y de Sinaloa se encontraron ejemplares con los dos tipos en el mismo organismo.

En cuanto a la presencia de melanismo ventral, se observó con mucho mayor frecuencia en los organismos de Morelos y Sinaloa que en los de Tlaxcala, en todos los casos se trató de pigmentación amarillenta en las piernas.

B) CITOGENETICA

En la mayoría de los organismos fue posible obtener material

CUADRO No 4: LOCALIDADES Y FECHAS DE RECOLECTA

LOCALIDAD	FECHA	No. EJEM.
- "EL RODEO", MOR.	OCT. '79	12
- XIUTEPEC, MOR.	JUL. '87	2
	SEP. '87	10
	OCT. '87	9
	TOTAL:	33
- GUASAVE, SIN.	ENE. '80	13
	JUL. '80	13
	OCT. '88	22
	TOTAL	48
- TECOMALUCAN, TLAX.	AG. '83	6
	MAY. '84	14
	JUN. '87	8
	TOTAL	28
	GRAN TOTAL	109

cromosómico tanto de la médula ósea como de linfocitos; sin embargo en algunos casos se obtuvo sólo de un tejido u otro. Esto fue particularmente notorio en los ejemplares recolectados en invierno pues sus huesos contenían una gran cantidad de grasa almacenada.

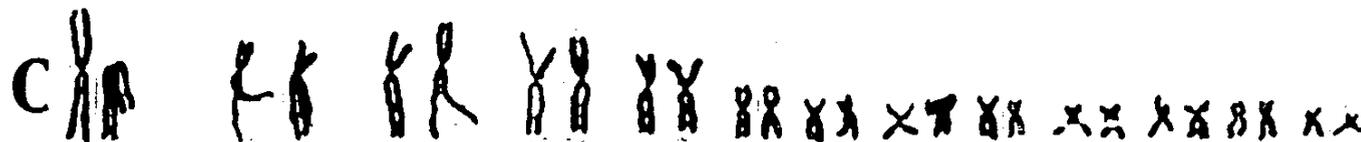
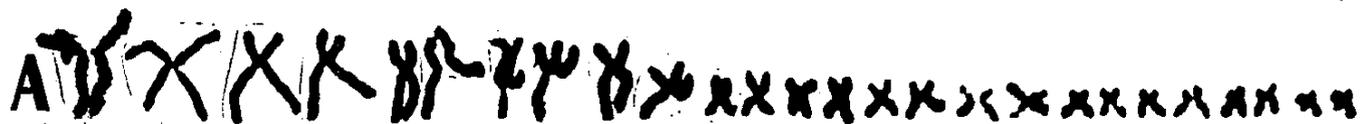
El número modal de cromosomas registrado en los mitosis de cada individuo fue, en todos los casos, de 26 por lo que se consideró como el número diploide de cada muestra.

Los cariotipos se elaboraron con las fotografías de las figuras mitóticas de mejor calidad de las preparaciones de linfocitos y de médula ósea. Todas las poblaciones presentaron el cariotipo típico de las especies del género Rana, formado por trece pares de cromosomas, cinco de ellos notablemente mayores que los ocho restantes (fig No 6).

No se observaron diferencias entre los cariotipos obtenidos de células de la médula ósea y de linfocitos de la sangre, ni entre los dos sexos.

De los 57 individuos procesados en total, sólo se obtuvieron mitosis analizables en 18 de ellos, seis de cada muestra. Así, de Morelos, se obtuvieron 16 cariotipos, de Sinaloa 13 y de Tlaxcala 11. Con ellos se trabajó para obtener los datos morfométricos de los cromosomas y elaborar los idiogramas respectivos.

En los Cuadros Nos 5, 6 y 7, se presentan los datos de longitud absoluta promedio de los trece pares cromosómicos registrados en cada una de las localidades de colecta; con ellos se realizaron los cálculos para obtener la longitud total relativa de



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FIGURA No. 6: CARIOTIPOS DE LAS POBLACIONES DE RAMAS LEOPARDO DE MORELOS (A), SINALOA (B) Y TLAXCALA (C).

CUADRO No 5: DATOS DE LONGITUDES ABSOLUTAS (CMS) PROMEDIO DE P, Q Y Q+P DE LA POBLACION DE RANAS LEOPARDO DE XIUTEPEC, MOR.

CROMOSOMA	BRAZO CORTO P	BRAZO LARGO Q	LONG. TOTAL P+Q
1	1.17 (0.51)	1.43 (0.61)	2.70 (1.00)
2	0.86 (0.28)	1.30 (0.38)	2.16 (0.63)
3	0.74 (0.29)	1.19 (0.43)	1.94 (0.71)
4	0.71 (0.25)	1.10 (0.31)	1.81 (0.53)
5	0.69 (0.21)	0.98 (0.29)	1.67 (0.48)
6	0.48 (0.17)	0.64 (0.21)	1.12 (0.37)
7	0.43 (0.12)	0.58 (0.21)	1.02 (0.32)
8	0.43 (0.15)	0.57 (0.19)	0.99 (0.33)
9	0.36 (0.13)	0.52 (0.17)	0.88 (0.29)
10	0.35 (0.13)	0.50 (0.17)	0.85 (0.29)
11	0.35 (0.14)	0.48 (0.15)	0.83 (0.28)
12	0.33 (0.15)	0.49 (0.16)	0.82 (0.30)
13	0.26 (0.10)	0.42 (0.11)	0.68 (0.21)

NOTA: Los valores entre () corresponden a la desviación estándar.

CUADRO No 5: DATOS DE LONGITUDES ABSOLUTAS (CMS) PROMEDIO DE P, Q Y Q+P DE LA POBLACION DE RANAS LEOPARDO DE GUASAVE, SIN.

CROMOSOMA	BRAZO CORTO P	BRAZO LARGO Q	LONG. TOTAL P+Q
1	1.41 (0.33)	1.70 (0.38)	3.11 (0.68)
2	0.96 (0.24)	1.70 (0.38)	2.66 (0.57)
3	0.96 (0.27)	1.46 (0.31)	2.42 (0.52)
4	0.85 (0.24)	1.45 (0.36)	2.29 (0.54)
5	0.90 (0.25)	1.30 (0.33)	2.21 (0.54)
6	0.59 (0.16)	0.80 (0.18)	1.39 (0.32)
7	0.52 (0.13)	0.76 (0.14)	1.27 (0.25)
8	0.46 (0.09)	0.68 (0.15)	1.14 (0.22)
9	0.42 (0.10)	0.64 (0.13)	1.06 (0.22)
10	0.40 (0.12)	0.61 (0.15)	1.02 (0.25)
11	0.39 (0.12)	0.60 (0.10)	0.99 (0.20)
12	0.32 (0.10)	0.60 (0.13)	0.93 (0.20)
13	0.25 (0.07)	0.54 (0.19)	0.79 (0.25)

NOTA: Los valores entre () corresponden a la desviación estándar.

CUADRO No 7: DATOS DE LONGITUDES ABSOLUTAS (CMS) PROMEDIO DE P, Q Y Q+P DE LA POBLACION DE RANAS LEOPARDO DE TECOMALUCAN, TLAX.

CROMOSOMA	BRAZO CORTO P	BRAZO LARGO Q	LONG. TOTAL P+Q
1	1.77 (0.29)	1.95 (0.37)	3.72 (0.64)
2	1.14 (0.25)	2.12 (0.44)	3.26 (0.62)
3	1.19 (0.31)	1.94 (0.37)	3.12 (0.62)
4	1.09 (0.18)	1.74 (0.42)	2.83 (0.50)
5	1.21 (0.32)	1.44 (0.28)	2.56 (0.555)
6	0.80 (0.12)	0.96 (0.18)	1.76 (0.29)
7	0.68 (0.13)	0.92 (0.25)	1.60 (0.35)
8	0.64 (0.18)	0.86 (0.23)	1.50 (0.37)
9	0.55 (0.15)	0.77 (0.22)	1.32 (0.32)
10	0.51 (0.15)	0.77 (0.14)	1.28 (0.27)
11	0.53 (0.18)	0.73 (0.20)	1.26 (0.34)
12	0.42 (0.11)	0.69 (0.17)	1.10 (0.26)
13	0.41 (0.15)	0.63 (0.16)	1.04 (0.28)

NOTA: Los valores entre () corresponden a la desviación estándar.

cada par en cada una de las muestras (Cuadro No 8): se puede apreciar que prácticamente no existen diferencias significativas entre ellas en este aspecto y para verificar esto se aplicó la prueba estadística de "t" de Student y se encontraron los siguientes valores: Mor vs Ilox = 0.04; Mor vs Sin 0.03 y Sin vs Ilox 0.01. El valor de P fue mayor que 0.05 en todos los casos por lo que en ninguno de ellos hay diferencia estadísticamente significativa.

Los valores de la proporción de brazos (q/p) que fueron calculados para clasificar a los cromosomas de acuerdo con la posición de su centrómero se encuentran en el Cuadro No 9. En éste se observa que sólo hay cromosomas de dos tipos: metacéntricos y submetacéntricos, y que son más frecuentes los primeros en las tres muestras. Es evidente también que el número de submetacéntricos es diferente en las tres poblaciones: en Morelos sólo se encontró el par 13, en Sinaloa los pares 2, 4, 12 y 13, y en Iloxcala solo el par 2 (Fig No. 7).

Con respecto a la obtención de bandas cromosómicas G, se lograron resultados bastante satisfactorios que permitieron determinar, hasta este momento, el patrón de bandas de cada par cromosómico de los ejemplares de Iloxcala, el cual se presenta en la Figura No 8.

En ella se puede observar que el número de bandas positivas y negativas varía entre 8 y 18. En el grupo de los cromosomas grandes, los dos primeros presentan el mayor número y se nota que en el brazo largo del par 2 hay 12 bandas; en el grupo de los

CUADRO No 8: VALORES PROMEDIO DE LA LONGITUD TOTAL RELATIVA (%) DE LAS TRES POBLACIONES DE RANA LEOPARDO ESTUDIADAS, (COMPLEMENTO DIPLOIDE).

CROMOSOMA	MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
1	14.89	14.63	14.06
2	12.37	12.52	12.33
3	11.05	11.39	11.83
4	10.37	10.82	10.70
5	9.56	10.35	10.02
6	6.41	6.54	6.65
7	5.78	6.02	6.05
8	5.72	5.36	5.67
9	5.04	4.99	4.99
10	4.86	4.75	4.84
11	4.75	4.65	4.76
12	4.70	4.33	4.20
13	3.89	3.72	3.93
TOTAL	99.39	100.00	100.00

CUADRO No 9: VALORES PROMEDIO DE LA PROPORCION DE BRAZOS (Q/P) Y CLASIFICACION DE LOS CROMOSOMAS DE LAS POBLACIONES DE RANA LEOPARDO ESTUDIADAS, SEGUN LA POSICION DEL CENTROMERO. (Levan, et al, 1964).

CROMOSOMA	MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
1	1.18 (0.27) M	1.23 (0.17) M	1.10 (0.09) M
2	1.57 (0.32) M	1.81 (0.34) SM	1.92 (0.38) SM
3	1.59 (0.37) M	1.58 (0.37) M	1.69 (0.33) M
4	1.62 (0.37) M	1.76 (0.39) SM	1.55 (0.50) M
5	1.44 (0.23) M	1.49 (0.29) M	1.23 (0.21) M
6	1.36 (0.24) M	1.39 (0.18) M	1.21 (0.13) M
7	1.34 (0.22) M	1.52 (0.28) M	1.37 (0.31) M
8	1.35 (0.23) M	1.49 (0.28) M	1.40 (0.43) M

CUADRO No. 9: CONTINUACION

CROMOSOMA	MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
9	1.49 (0.32) M	1.57 (0.27) M	1.43 (0.39) M
10	1.47 (0.25) M	1.56 (0.24) M	1.50 (0.40) M
11	1.43 (0.21) M	1.65 (0.38) M	1.48 (0.40) M
12	1.56 (0.32) M	1.92 (0.39) SM	1.69 (0.42) M
13	1.82 (0.65) SM	2.14 (0.57) SM	1.62 (0.36) M

NOTA: M = metacéntrico; SM = submetacéntrico.

Los valores entre () corresponden a la desviación estándar

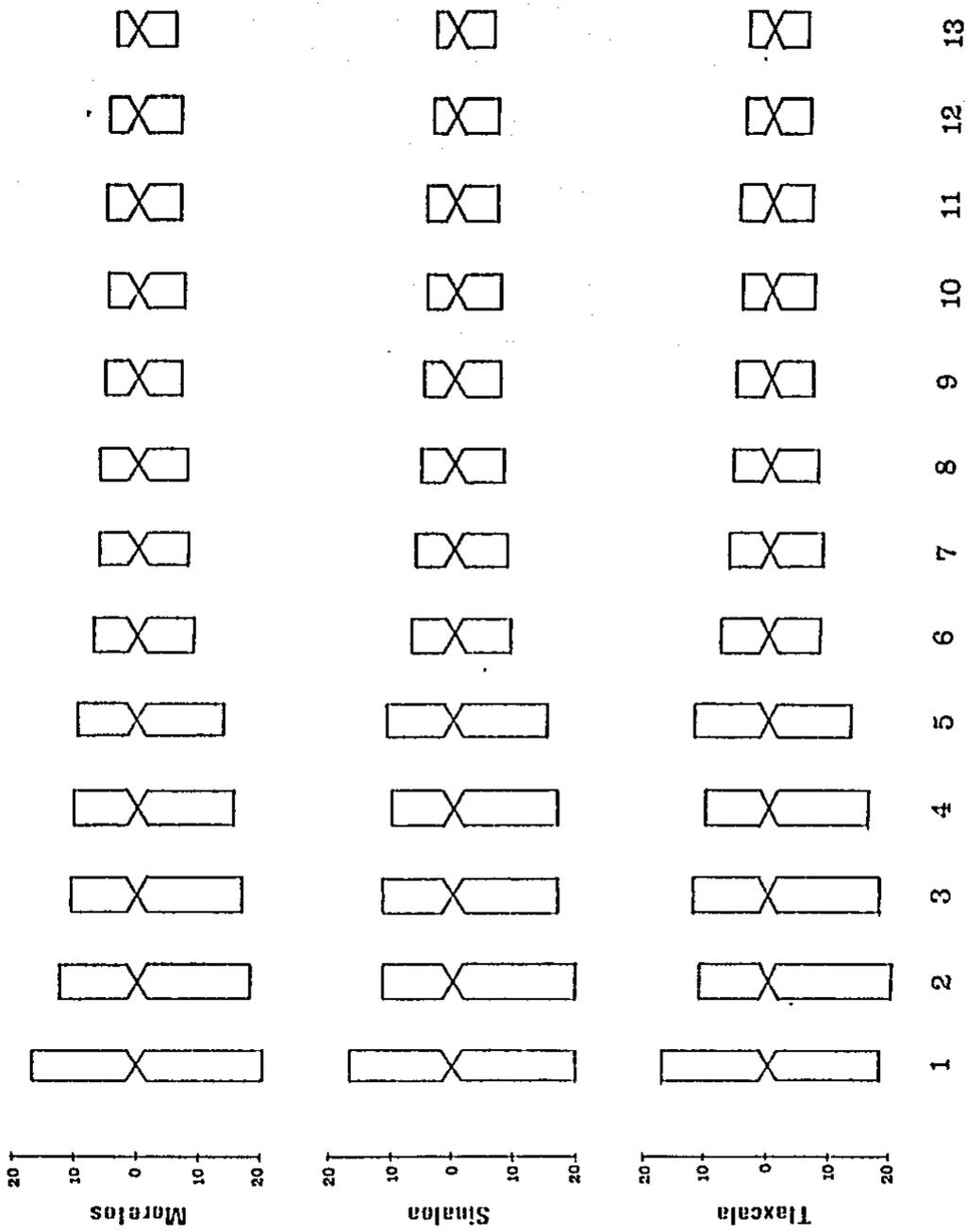


FIGURA No 7: IDIAGRAMAS DE LAS TRES POBLACIONES DE RANAS LEOPARDO ESTUDIADAS.

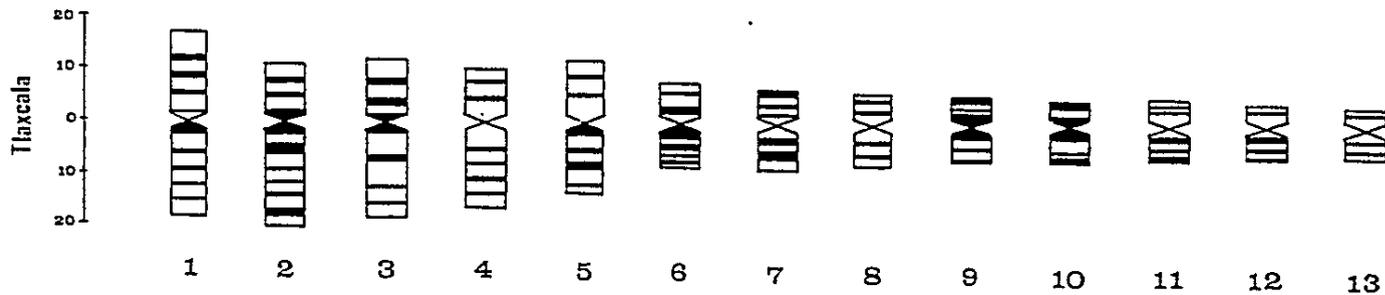


FIGURA No. 8: BANDAS CROMOSOMICAS 6 DE LA POBLACION DE RANAS LEOPARDO DE TECOMALUCAN, TLAXCALA.

cromosomas pequeños el número de bandas presentes en cada uno de los brazos es más uniforme, pero hay diferencias en lo que a su tamaño y distribución se refiere.

D) ISOENZIMAS

Se procesaron las muestras de tejidos hepáticos y musculares de 15 ejemplares de Morelos, 22 de Sinaloa y 4 de Tlaxcala, y se resolvieron un total de 34 loci pertenecientes a las 28 enzimas ensayadas, excepto AP, FUM y G6PD (Cuadro No 2), en las tres poblaciones.

En el Cuadro No 10 se enlistan los alelos encontrados en cada locus así como sus frecuencias en cada una de las poblaciones; si se aplica el criterio de polimorfismo de 0.95 según el cual un locus se considera polimórfico si el alelo más abundante no presenta una frecuencia mayor a 0.95, se observa que hay 15 loci polimórficos, y que las frecuencias de sus alelos varían en cada una de las muestras.

En Morelos se registraron 10 loci con más de un alelo, (AAT-2, ACDN, CAT, aGPD, LDH-1, MDH-1, MPI, PGDH, SOD-2 y ADA), mientras que en Sinaloa hubo 11, (AAT-2, aGPD, β GUR, MDH-1, MPI, PGDH, TPI, ADA, CaBP, CK e IDDH); en Tlaxcala sólo se encontraron 3, (AAT-2, MDH-1 y SOD-2).

Las tres poblaciones comparten dos de esos loci, AAT-2 y MDH-1; los únicos tres loci polimórficos presentes en Tlaxcala (AAT-2, MDH-1 y SOD-2) lo son también en Morelos, mientras que con Sinaloa sólo comparte dos (AAT-2 y MDH-1). Entre Morelos y

CUADRO No 10: FRECUENCIAS ALELICAS ENCONTRADAS EN LOS LOCI DETECTADOS EN LAS TRES POBLACIONES DE RANA LEOPARDO EN ESTUDIO.

LOCUS	ALELO	FRECUENCIA		
		MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
- AAT - 1	A	1.000	1.000	1.000
- AAT - 2	A	0.692	0.833	0.667
	B	0.308	0.167	0.333
- ACON	A	0.333	1.000	1.000
	B	0.667	0.000	0.000
- CAT	A	0.100	1.000	1.000
	B	0.900	0.000	0.000
- EST - 1	A	1.000	1.000	1.000
- EST - 2	A	1.000	1.000	1.000
- eGPD	A	0.750	0.810	1.000
	B	0.250	0.000	0.000
	C	0.000	0.190	0.000
- eGUR	A	1.000	0.955	1.000
	B	0.000	0.045	0.000
- eGSD	A	1.000	1.000	1.000
- eMAN	A	1.000	1.000	1.000
- LDH - 1	A	0.864	1.000	1.000
	B	0.136	0.000	0.000
- LDH - 2	A	1.000	1.000	1.000
- MDH - 1	A	0.708	0.955	0.833
	B	0.292	0.045	0.167
- MDH - 2	A	1.000	1.000	1.000
- ME - 1	A	1.000	1.000	1.000
- ME - 2	A	1.000	1.000	1.000
- MPI	A	0.385	0.909	1.000
	B	0.615	0.091	0.000

CUADRO 10: CONTINUACION

LOCUS	ALELO	FRECUENCIA		
		MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
- PEP - GL1	A	1.000	1.000	1.000
- PEP - LGG	A	1.000	1.000	1.000
- PEP - LP	A	1.000	1.000	1.000
- PGDH	A	0.923	0.955	1.000
	B	0.077	0.045	0.000
- PGM - 1	A	1.000	1.000	1.000
- PGM - 2	A	1.000	1.000	1.000
- SOD - 1	A	1.000	1.000	1.000
- SOD - 2	A	0.538	1.000	0.333
	B	0.462	0.000	0.667
- TPI	A	1.000	0.977	1.000
	B	0.000	0.023	0.000
- ADA	A	0.667	0.775	1.000
	B	0.250	0.050	0.000
	C	0.083	0.000	0.000
	D	0.000	0.175	0.000
- AK	A	1.000	1.000	1.000
- CaBP	A	1.000	0.975	1.000
	B	0.000	0.025	0.000
- CK	A	1.000	0.950	1.000
	B	0.000	0.050	0.000
- G3PDH	A	1.000	1.000	1.000
- IDDH	A	1.000	0.975	1.000
	B	0.000	0.025	0.000
- PEP - LGL	A	1.000	1.000	1.000
- PEP - LLL	A	1.000	1.000	1.000

Sinaloa hay mayor similitud en lo referente a los loci con más de un alelo, pues comparten seis de ellos, (RAI-2, aGPD, MOH-1, MPI, PGDH Y AOR).

La variabilidad genética de las poblaciones estudiadas fue evaluada a través del número de alelos promedio por locus, el porcentaje de loci polimórficos en cada una de ellas y la heterocigosidad; estos datos se encuentran resumidos en el Cuadro No. 11. Es evidente que existen diferencias en lo que a grado de polimorfismo y de heterocigosidad se refiere; en el primer caso, la muestra con mayor porcentaje de loci polimórficos, al aplicar el criterio de 0.95, fue Morelos seguida por Sinaloa y finalmente Tlaxcala, y la que menor heterocigosidad presentó fue la de Sinaloa (50 % de la calculada para Morelos y Tlaxcala).

Los índices de identidad y distancias genéticas de Nei (1972) obtenidos se presentan en el Cuadro No 12 y los dendrogramas de la Figura No 9 fueron elaborados con los índices de identidad y distancias genéticas de Rogers (1972). En ambos casos se observa que existe similitud genética entre las tres poblaciones.

D I S C U S I O N

En virtud de que las investigaciones más relevantes en las poblaciones mexicanas de rana leoparda han sido realizadas por Frost (1982), Hillis (1983; 1988) y Hillis y Frost (1985) en esta década, se notará una inclinación a la comparación con los datos publicados por ellos a lo largo de esta discusión.

CUADRO No 11: EVALUACION DE LA VARIACION GENETICA ENTRE LAS TRES POBLACIONES DE RANA LEOPARDO ESTUDIADAS.

	MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
- PROMEDIO DE ALELOS/LOCUS	1.32	1.35	1.09
- PROM. DE HETEROCIGOSIDAD/ LOCUS	0.05	0.02	0.05
- % DE LOCI POLIMORFICOS	29.41	14.71	8.82

CUADRO No 12: MATRIZ DE COEFICIENTE DE IDENTIDAD GENETICA (ARRIBA DE LA DIAGONAL) Y DE DISTANCIA GENETICA (ABAJO DE LA DIAGONAL) PARA LAS POSIBLES COMBINACIONES DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.

	MORELOS	SINALOA	TLAXCALA
MORELOS	-----	0.938	0.942
SINALOA	0.180	-----	0.982
TLAXCALA	0.060	0.063	-----

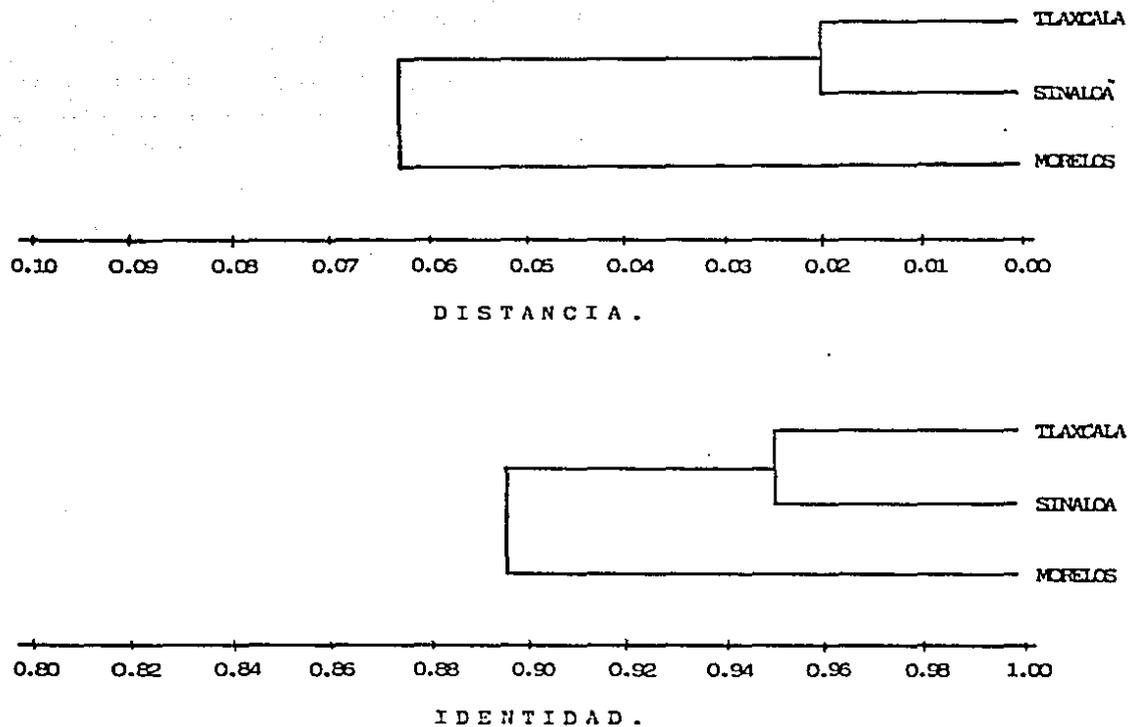


FIGURA No 9: DENDROGRAMAS ELABORADOS CON LOS COEFICIENTES DE SIMILITUD Y DISTANCIA GENÉTICAS DE ROGERS (1972).

Antes de iniciar la discusión de los aspectos cromosómicos y bioquímicos, se harán consideraciones acerca de algunas características morfológicas, en virtud de su importancia como caracteres diagnósticos en la identificación de las especies.

Como se mencionó en la Introducción, Sanders y Smith (1971) y Sanders (1973) describieron varias subespecies de R. berlandieri con base en el patrón de manchas dorsales, la forma de los pliegues dorsolaterales, el melanismo ventral y la presencia de oviductos vestigiales en los machos. Hillis y Frost (1985) también utilizan la forma de los pliegues y la presencia de oviductos vestigiales entre otras características diagnósticas para describir las nuevas especies en la región central del país.

De acuerdo con las observaciones realizadas a lo largo de este trabajo, se puede considerar que la forma de las manchas no es una característica con valor diagnóstico ya que en todas las poblaciones se encontraron los mismos tipos. Lo mismo se aplica a la forma de los pliegues dorsolaterales y, en lo que a melanismo ventral se refiere, los especímenes de Morelos y Sinaloa lo presentaron constantemente, por lo que, de considerarse como pertenecientes a especies diferentes, pierde valor diagnóstico.

CROMOSOMAS

Desde hace ya muchos años (Morescalchi, 1973), se sabe que cada especie posee un cariotipo característico cuya morfología puede considerarse como parte de su fenotipo y que es susceptible de sufrir cambios a lo largo del tiempo.

Los resultados cromosómicos obtenidos en este trabajo apoyan por completo las ideas expresadas en la Introducción por el Morescalchi, 1967 en relación al cariotipo de los Anuros, en virtud de que se obtuvo el cariotipo "típico" del grupo, en cuanto a número y tamaño se refiere en las tres poblaciones. El hecho de que no exista diferencia en la longitud relativa de cada par entre las tres localidades sugiere que no ha habido pérdida ni ganancia de cromatina y que posiblemente la cantidad de ADN en los tres grupos sea la misma.

Las diferencias registradas en la posición del centrómero de los cromosomas entre las tres muestras confirman la idea de que la estabilidad del cariotipo en los Anuros es aparente (Morescalchi, 1973). Estas diferencias estructurales sugieren que posiblemente hayan ocurrido rearrreglos del tipo de las inversiones pericéntricas, y que los cromosomas con centrómero en posición media lo tuvieron desplazado hacia uno de sus extremos después de la inversión. El caso contrario, en el que un submetacéntrico se transformara en metacéntrico también puede ser, sin embargo, las evidencias sugieren que el cariotipo primitivo está constituido por cromosomas metacéntricos (Morescalchi, 1973; Hillis, 1988).

Al analizar los datos de índice centromérico calculados para los ejemplares de cada una de las tres localidades estudiadas, es evidente que en Sinaloa el número de submetacéntricos es mayor que en las otras dos y esto apoya a Frost (1982), en el sentido de considerarla como una población perteneciente a una especie diferente. Ahora bien, con respecto al cariotipo de los ejempla-

res de Morelos y Ixlaxcala, ambos presentan un solo par de subnucleocentros, sólo que en la primera población es el más pequeño (no 13) y en Ixlaxcala es el par 2. Esta observación permite sugerir que en estas dos poblaciones los rearrreglos cromosómicos podrían desempeñar un papel importante en el proceso de divergencia.

En relación a las bandas cromosómicas, durante los primeros intentos realizados para obtener las bandas G, en nuestro laboratorio encontramos resultados similares a los de Schmid (1978) y Manago *et al* (1980). Sin embargo, a través de las modificaciones sugeridas por Cerrillo y las propias, logramos obtener el patrón de bandas cromosómicas G en la muestra de Ixlaxcala, con una calidad comparable a la que se obtiene en cromosomas de mamíferos; esto pone en tela de juicio las hipótesis de Schmid (1978), Manago *et al* (1980) y Birstein (1982), en el sentido de que las características del ADN de estos organismos sean un impedimento para obtenerlas de buena calidad. Con las bandas como herramienta seremos capaces de confirmar los rearrreglos cromosómicos sugeridos en los párrafos anteriores, de detectar algunos otros y de caracterizar los cariotipos de las diferentes poblaciones, a un nivel más fino para compararlas en forma más precisa y de acuerdo con Hillis (1988), poder determinar con mayor precisión su modelo de evolución cromosómica.

ISOENZIMAS

Como se mencionó en la Introducción, la variación genética

puede ser estimada mediante el polimorfismo y la heterocigosidad en un número representativo de loci en una población (Hartl, 1980; Ayala, 1984).

En este estudio se cumplió con esa condición y aunque de la población de Tlaxcala sólo se utilizaron tejidos de cuatro individuos, fue posible detectar loci polimórficos. Los datos de polimorfismo reflejan diferencias entre las tres poblaciones (Cuadro No. 11), sin embargo hay que recordar que esta medida de la variación no siempre es útil, ya que puede ser, en ocasiones, arbitraria e imprecisa debido a que su valor se ve afectado por el tamaño de la muestra pues a mayor número de individuos, mayor probabilidad de encontrar loci polimórficos) y por la frecuencia de los alelos pues no hay distinción entre alelos con baja y alta frecuencia en la población (Ayala, 1984).

Para evitar caer en esa imprecisión, dado el reducido tamaño de la muestra de Tlaxcala, podemos considerar a la heterocigosidad como medida de la variación genética; así, tenemos que hay menor variación en la población de Sinaloa, y el mismo grado de variación en las de Morelos y Tlaxcala a pesar de que el grado de polimorfismo es diferente. Esto se debe a que en los pocos loci polimórficos de Tlaxcala se registró una mayor heterocigosidad que en los de Morelos.

Al analizar los valores de los coeficientes de distancia e identidad genéticas, así como los dendrogramas obtenidos, se observa que todas tienen un elevado coeficiente de identidad genética, notándose un ligero alejamiento de la muestra de Morelos.

De acuerdo con Ayala (1984), esos valores de identidad corresponden a poblaciones locales pues están más cercanos a 0.970 que a 0.795 que corresponde a subespecies, por lo que las diferencias observadas entre las tres muestras podrían considerarse como debidas al azar y por lo tanto no significativas. Hartl (1980) comenta que los valores de distancias genéticas (D) son muy variables por lo que algunas categorías taxonómicas se sobreponen; de esta manera, los resultados de distancia obtenida entre Morelos - Tlaxcala y Tlaxcala - Sinaloa pueden corresponder tanto a poblaciones locales (D = 0.00 a 0.05) como a subespecies (D = 0.02 a 0.20) y, la distancia obtenida entre Morelos - Sinaloa corresponde a la categoría de subespecie o incluso a la de especies diferentes (D = 0.10 a 2.0).

Hillis et al (1983), en su evaluación bioquímica anteriormente referida, no analizan la estructura genética de las poblaciones estudiadas, por lo que desafortunadamente no mencionan el tamaño de sus muestras ni las frecuencias de los alelos encontrados. Sin embargo es posible realizar algunas comparaciones entre los datos obtenidos en las poblaciones de este estudio y algunas de sus muestras. Por ejemplo, entre R. forreri y Sinaloa que provienen de localidades cercanas, (Escuinapa y Guasave, Sin); en el caso de Morelos y Tlaxcala puede ser con la forma Hidalgo, en virtud de que pertenece a la localidad más cercana (11 Km E del entronque de las carreteras 15 y 51, Michoacán) y a que tanto esta muestra como las de Morelos y Tlaxcala se encuentran dentro del área de distribución de R. spectabilis.

En el Cuadro No 13, se resumen los datos de número de alelos por locus registrados en este trabajo y los obtenidos por Hillis *et al* (1983) en esos mismos loci en sus muestras de R. forreri y de la forma Hidalgo. Al comparar R. forreri con Sinaloa, se observa que comparten quince loci monomórficos (65.22 %) y que R. forreri no presenta, aparentemente loci con más de 2 alelos, mientras que en Sinaloa se detectaron ocho; de la comparación de la forma Hidalgo con la población de Morelos resulta que son similares en 14 loci con un solo alelo (60.87 %); hay ocho loci monomórficos en la forma Hidalgo que presentan más de un alelo en Tlaxcala. Finalmente, la forma Hidalgo comparte 20 loci monomórficos con Tlaxcala (86.96 %).

Estos resultados parecen ser bastante congruentes, sin embargo, al establecer la misma comparación entre R. forreri y Morelos y Tlaxcala se encuentra un 65.22 % y un 91.30 % respectivamente de loci monomórficos comunes, y entre la forma Hidalgo y Sinaloa, el 60.87 % de los loci son monomórficos.

Todo parece sugerir que aparentemente no hay diferencias significativas en las estructuras genéticas de estas cinco muestras, lo cual confirma la estrecha relación existente entre ellas como parte que son del complejo R. pipiens.

El análisis y comparaciones realizadas en las páginas previas, permiten en este momento proponer un análisis integral de los datos de que se dispone.

Todas las semejanzas encontradas en las tres muestras, en los aspectos estudiados tienen fácil explicación, pues todas per-

CUADRO No 13: ALELOS ENCONTRADOS EN 23 LOCI EN CINCO MUESTRAS DE RANAS LEOPARDO: DE MORELOS, SINALOA Y TLAXCALA (ESTE TRABAJO), R. forreri Y LA FORMA HIDALGO, (HILLIS ET AL, 1983).

LOCUS	SINALOA	R. forreri	MORELOS	TLAXCALA	FORMA HIDALGO
- ACON	A	B	A,B	A	C
- CAT	A	D	A,B	A	C
- aGPD	A,B,C	A	A,B	A	A
- βGUR	A,B	F	A	A	F
- βGSD	A	E	A	A	E,I
- aMAN	A	C	A	A	C
- LDH-1	A	H	A,B	A	E
- LDH-2	A,B	B	A,B	A,B	B
- ME-1	A	F	A	A	B
- ME-2	A	F	A	A	B
- MPI	A,B	N	A,B	A	P
- PEP-LP	A	H	A	A	J
- PEP-LGG	A	D	A	A	D
- PEP-LA	A	C	A	A	C
- PGM	A	B	A	A	B
- SOD-1	A	B	A	A	F
- SOD-2	A	A	A,B	A,B	A
- TPI	A,B	A	A	A	A
- ADA	A,B,D	D	A,B,C	A	D
- AK	A	B	A	A	C
- CK	A,B	A	A	A	A
- G3PDH	A	E	A	A	L
- IDDH	A,B	C	A	A	C

tenecen al mismo complejo taxonómico, y las diferencias observadas pueden utilizarse para distinguir a las diversas especies y para conocer los mecanismos por los cuales divergen.

Como ya se ha mencionado Frost (1982), basándose en sus resultados de cruzas experimentales entre R. h. forreri y R. h. berlandieri, del análisis electroforético de albúminas y de la estructura de los cantos, propuso que se elevara al nivel de especie a la primera de esas subespecies. Los datos cromosómicos y de distancia genética obtenidos en este trabajo apoyan a los de Frost, pues de los tres cariotipos obtenidos, el de Sinaloa fue el más disímil y su valor de distancia genética entra en la categoría de especie diferente. Así, se considera que esa muestra pertenece a la especie R. forreri cuya morfología cromosómica además confirma el importante papel que pueden desempeñar los cambios cromosómicos durante los procesos de especiación.

Hillis y Frost (1985), describen a R. spectabilis y a otras dos nuevas especies con base en algunas combinaciones de características morfológicas en adultos y renacuajos, además de varios marcadores aloenzimáticos únicos encontrados por Hillis et al (1983). El holotipo de esta especie proviene de La Estanzuela, Hidalgo, situado a 2,900 msnm, y los paratipos fueron colectados en los estados de Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Sin embargo, al revisar las localidades en las que analizaron isoenzimas no hay representantes de Tlaxcala y, aunque se menciona una de Morelos, Santa Fe, 99° 14' W, 32° 19' N), no aparecen publicados los alelos ahí encontrados.

Las muestras de Morelos y Ixtacala están inscritas dentro del área de distribución de la especie *R. spectabilis* descrita en 1985, por lo que podrían considerarse como pertenecientes a ella, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo en lo que a estructura cromosómica se refiere, muestran diferencias en los cariotipos de ambas localidades y también el valor de distancia genética entre ellas tiende hacia la categoría taxonómica de subespecie. Es muy probable, en virtud de la alta heterocigosidad registrada en los loci polimórficos de Ixtacala, que si se incrementara el tamaño de la muestra de esta localidad para el análisis de isoenzimas, se encontraría mayor número de loci polimórficos y quizá, alelos característicos de esa población que permitirían confirmar su identidad taxonómica de manera más precisa. Con los datos disponibles en este momento se puede considerar que pertenecen a la misma especie y se apoya la posibilidad de que el proceso de divergencia ya se haya iniciado.

Sería muy conveniente complementar los resultados aquí presentados, con el propósito de poder emitir juicios más concluyentes.

Así en el aspecto citogenético, deberán obtenerse los patrones de bandas cromosómicas G de las poblaciones de Morelos y Sinaloa y aplicar otras técnicas de tinción diferencial como las de bandas C y NOR para caracterizar más aún los cromosomas de cada localidad.

En el aspecto bioquímico, además de incrementar el tamaño de la muestra de Ixtacala el analizar otras proteínas como las hemo-

globinas, albúminas y melaninas podría proporcionar información valiosa respecto a las relaciones que guardan entre sí estos organismos.

Finalmente, también sería conveniente integrar el aspecto morfológico de cada población para poder relacionar sus características externas con sus cariotipos y principalmente con las proteínas que producen en diferentes etapas de su vida los individuos de ambos sexos.

C O N C L U S I O N E S

Con base en la discusión previa, se concluye que:

- Las poblaciones de rana leopardo estudiadas presentan un número diploide $2n = 26$, al igual que la mayoría de las especies del género Rana.

- Las diferencias morfológicas de los cromosomas, en particular la posición del centrómero, apoyan la idea de que la estabilidad del cariotipo de estos organismos es aparente y que no excluye la ocurrencia de rearrreglos cromosómicos.

- Se lograron obtener bandas cromosómicas G en los cromosomas de estos anfibios, y esto permitirá conocer más acerca de los mecanismos de su evolución cromosómica.

- El grado de similitud genética en las tres poblaciones es elevado y confirma la estrecha relación que existe entre ellos como miembros del complejo R. *parsons*.

- Los valores de distancia genética encontrados sugieren la acción de mecanismos de divergencia en estas poblaciones.

- Con base en los resultados obtenidos y de acuerdo con la propuesta de Frost (1982), se considera a las ranas recolectadas en el estado de Sinaloa como pertenecientes a la especie R. forreri, y se sugiere que posiblemente las poblaciones de Morelos y Ixtacala se encuentren en proceso de divergencia, aunque con los conocimientos actuales se incluyan en la especie R. spectabilis.

B I B L I O G R A F I A

- Aguilar, M.R., Sites, J., Murphy, R. Genetic variability and population structure in the lizard genus Petrosaurus (Iguanidae). J. Herpetol. 22 (2): 135 (1988).
- Ayala, F., Kiger, J. 1984. Genética Moderna. Interamericana. España.
- Birstein, U. Structural characteristics of genome organization in Amphibians: differential staining of chromosomes and DNA structure. J. Mol. Evol. 18: 73 (1982).
- Brewer, G. 1970. An introduction to isozyme techniques. Academic Press. USA.
- Case, S. Biochemical systematics of members of the genus Rana native to Western North America. Syst. Zool. 27(3): 299 (1978).
- Cerrillo, M. Comunicación personal. (1985).
- Cruze, P., Patterson, M. 1973. Issue Culture. Academic Press. USA.
- Fowler, J. The Rana pipiens problem, a proposed solution. Am. Nat. 98(901): 213 (1964).
- Frost, J. Functional Genetic similarity between geographically separated populations of Mexican leopard frogs (Rana pipiens complex). Syst. Zool. 31 (1): 57 (1982).
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Instituto de Geografía, UNAM. México.

- Guttman, S. Biochemical techniques and problems in Anuran evolution. en Uial, J.L. Evolutionary Biology of the Anurans. 1973 Univ. Missouri Press. U.S.A.
- Harris, H., Hopkinson, D. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in Human Genetics. Elsevier/North Holland. USA.
- Hartl, D. 1980. Principles of Population Genetics. Sinauer Ass. Inc. USA. (1980).
- Hillis, D. Systematics of the Rana pipiens complex: puzzle and paradigm. Ann. Rev. Ecol. Syst. 19: 39 (1988).
- Hillis, D., Frost, J., Wright, D. Phylogeny and biogeography of the Rana pipiens complex: a biochemical evaluation. Syst. Zool. 32 (2): 132 (1983).
- Hillis, D., Frost, J. Three new species of leopard frogs (Rana pipiens complex) from the Mexican Plateau. Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas (117): 1 (1985).
- International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee. 1984. Enzyme Nomenclature. Academic Press. USA.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. Hereditas 52: 201 (1964).
- Littlejohn, M., Oldham, R. Rana pipiens complex: mating call structure and taxonomy. Science 162: 1003 (1968).
- Manago, J., Spina, F., Beckert, U. Differential staining of cultured bone marrow cell chromosomes of Rana pipiens. Cytologia 45: 561 (1980).
- Mayr, E. 1973. Populations, species, and Evolution. Harvard University Press. U.S.A. (1973).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Mc Alister, W. Artificial hybridization between R. a. arcolata and R. n. pipiens from Texas. Tex. J. Sci. 13: 423 (1961).
- Mechan, J. New information from experimental crosses on genetic relationships within the Rana pipiens species group. J. Exp. Zool. 170: 169 (1969).
- Morescalchi, R. Le relazioni tra il coriotipo di Anuri Diplo-sioceli: I. Il corredo cromosomico di alcuni Ranidae. Caryologia 20 (1): 65 (1967).
- Morescalchi, R. Amphibia. in Chiarelli, C., Capanna, E. (Eds). 1973. Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution. Academic Press. U.S.A.
- Murphy, R., Crabtree, C.B. Evolutionary aspects of isozyme patterns, number of loci, and tissue-specific gene expression in the prairie rattlesnake, Crotalus viridis viridis. Herpetologica 41: 451 (1985).
- Nei, M. Genetic distance between populations. Amer. Natur. 106: 283 (1972).
- Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583 (1978).
- Pace, R. Systematic and biological studies of the leopard frogs (Rana pipiens complex) of the United States. Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich. 134: 1 (1974).
- Platz, J., Platz, R. Rana pipiens complex: hemoglobin phenotypes of sympatric and allopatric populations in Arizona. Science 179: 1334 (1973).

- Rider, C., Taylor, C. 1980. Isoenzymes. Chapman & Hall. USA.
- Rogers, J.S. Measure of genetic similarity and genetic distance Univ. Texas Publ. Genet. 7213: 145 (1972)
- Rudich, J. Sinopsis biológica y de explotación sobre las principales especies del género Rana en México. Tes. Prof. Fac. Ciencias, UNAM. (1980).
- Sanders, O. A new leopard frog (Rana berlandieri brownorum) from Southern Mexico. J. Herpetol. 7: 87 (1973).
- Sanders, O., Smith, H. Skin tags and ventral melanism in the Rio Grande leopard frog. J. Herpetol. 5: 31 (1971).
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Chromosoma 66: 361 (1978).
- Selander, R., Smith, S., Yang, Y., Johnson, W., Gentry, G. Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus. Variation in the old field mouse (P. polionotus). Univ. Texas Publ. Genet. (7103): 49 (1971).
- Seto, I., Rounds, D. 1965. Cultivation of tissues and leukocytes from Amphibians. Methods in Cell Biology III. USA.
- Sites, J. Comunicación personal. (1986).
- Swofford, D., Selander, R. BIOSYS - I: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. J. Hered. 72: 281 (1981).
- Thompson, P., Sites, J. Comparison of population structure in chromosomally polytypic and monotypic species of Sceloporus (Sauria: Iguanidae) in relation to chromosomally-mediated speciation. Evolution 40: 303 (1986).

- Ijio, J., Whang, J.. Chromosome preparations of bone marrow cells without, "in vitro" culture of "in vivo" colchicine administration. *Stain. Technol.* 37: 17 (1962).
- Wang, H., Federoff, S. Factors affecting the quality of G bands produced by trypsin in human chromosomes. *Cytobios* 6: 47 (1972)