

**Informe final\* del Proyecto L244**  
**Sistemática de Bufo occidentalis Camerano 1879 (Anura: Bufonidae) en México**

**Responsable:** M en C. Georgina Santos Barrera  
**Institución:** Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología  
Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera"  
**Dirección:** Av. Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF,  
04510 , México  
**Correo electrónico:** [gsb@ciencias.unam.mx](mailto:gsb@ciencias.unam.mx); [gsantos@ecologia.unam.mx](mailto:gsantos@ecologia.unam.mx)  
**Teléfono/Fax:** Tel: 5622 4825 Fax: 5622 4828  
**Fecha de inicio:** Octubre 15, 1997  
**Fecha de término:** Diciembre 18, 2000  
**Principales resultados:** Base de datos, Informe final  
**Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Santos Barrera, G. 2000. Sistemática de Bufo occidentalis Camerano 1879 (Anura: Bufonidae) en México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L244.** México D. F.

**Resumen:**

Hace dos años se inicio el estudio sobre la Sistemática del grupo de sapos que conforman lo que se conoce en la literatura como Bufo occidentails. Los datos que se han generado muestran que esta especie constituye en realidad un "grupo de especies", cuyo número total es aún indefinido. En este trabajo se estudiará diferentes poblaciones de B. occidentails, con la finalidad de definir cuántas y cuales especies conforman dicho grupo. Para determinar cuáles son los límites taxonómicos entre estas poblaciones se propone analizar diferentes caracteres de morfología externa, en estas poblaciones, tales como los tipos de granulación y la coloración de las superficies dorsales y ventrales, arreglo de las crestas cefálicas y talla corporal, principalmente. Adicionalmente. se espera completar el trabajo con el análisis de electroforesis de proteínas (enzimas) en ejemplares pertenecientes a las diferentes poblaciones de B. occidentails. La segunda parte de este trabajo pretende definir cuales son las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman este grupo, y cuales son sus grupos más cercanamente relacionados. La técnica de análisis de estos es el de sistemática filogenética para el cual se empleará el programa computacional PAUP.

- 
- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
  - \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

**INFORME FINAL PROYECTO L244;**

**Sistemática de *Bufo occidentalis* Camerano, 1879  
(Anura:Bufonidae) en México.**

**M. en C. Georgina Santos Barrera  
Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM  
A. P. 70-399, C. P. 04510  
México, D. F.**

**Marzo del 2000**

## Informe final proyecto L244

### SISTEMÁTICA DE *Bufo occidentalis* Camerano,

1879 (Anura: Bufonidae) EN MEXICO

M. en C. Georgina Santos Barrera  
Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM  
A. P. 70-399, C. P. 04510, México, l). F.

## INTRODUCCIÓN

El género *Bufo* es un grupo de sapos muy diverso y habita en gran parte de las tierras conocidas en el mundo (Zug, 1993). En México la diversidad que alcanza es notable, hasta el momento se han registrado 28 especies, nueve de las cuales son endémicas de México. Dos de las 28 especies conocidas fueron descritas recientemente (Mendelson III, 1997a; 1997b), lo que habla de un interés importante en el estudio de estos anuros. Sin embargo, existen algunas especies cuya taxonomía está incompleta y con frecuencia resulta difícil identificarlas. Un claro ejemplo de esta situación es sin duda *Bufo occidentalis* Camerano, 1879, especie que se conoce desde 1878, aunque no se sabe con exactitud la fecha ni el lugar de recolecta de los primeros ejemplares, con los cuales se realizó la descripción. *B. occidentalis* había persistido en México sin cambios taxonómicos notables, fuera de la delimitación de su área de distribución, lo que condujo a definirla como una especie endémica de México con una distribución muy amplia en diversas y variadas localidades de nuestro país. Hace varios años se inicio el estudio sistemático de esta especie de sapos verdaderos en el Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias con la finalidad de aclarar si existían más de una especie involucradas en lo que se conoce desde hace más de un siglo como *Bufo occidentalis*. Los principales problemas taxonómicos, la historia de la delimitación de su distribución geográfica, así como la historia nomenclatura) tan interesante de esta especie se han descrito con detalle en Santos Barrera (1995).

Para facilitar el estudio taxonómico se identificaron 22 poblaciones de *B.*

*occidentalis* utilizando los registros procedentes de las principales colecciones herpetológicas de México, Estados Unidos de América y una en Italia, completándose con las recolectas en el campo realizadas en los últimos cuatro años. Los registros para esta especie de sapo provienen de más de 220 localidades pertenecientes a 20 de los 31 estados de la República Mexicana y abarcan diferentes ambientes como el bosque de encino, el bosque de pino y el matorral xerófilo. Una distribución geográfica tan amplia y la ausencia de subespecies descritas dentro de una única especie en donde se observan gran variedad de formas, fueron la clave para iniciar un estudio taxonómico de esta especie. Debe destacarse además, que no existen ejemplares tipo (holotipo y paratipos) designados para *B. occidentales*, y por lo tanto, es indispensable redescubrir esta especie, designando el lectotipo y los paralectotipos correspondientes (Santos-Barrera y Flores-Villela, en prep).

La manera en la que se ha abordado el estudio de esta especie ha sido fundamentalmente la comparación de caracteres morfológicos externos entre los ejemplares disponibles pertenecientes a diferentes poblaciones a lo largo de la distribución de *B. occidentales*. Este primer análisis condujo a reconocer cuatro diferentes morfotipos dentro de la especie, es decir, cuatro diferentes grupos de organismos con una única combinación de caracteres cada uno. A pesar de reconocer esos grupos, existen otras poblaciones que no fueron asignadas a alguno de los morfotipos antes mencionados quedando como un conjunto grande con una identidad taxonómica incierta (Santos Barrera, 1995). El uso de la estadística multivariada, para comparar la morfología de los adultos de diferentes poblaciones es la primera aproximación para definir los límites taxonómicos de las unidades (posibles especies), a lo que se ha sumado el uso de marcadores genéticos, como la electroforesis de enzimas, que ha sido la herramienta clave para definir la situación de las diferentes poblaciones que en su conjunto conforman la especie *B. occidentales*.

En este trabajo se pretende dilucidar cuántas y cuáles especies conforman lo que desde hace un par de años propuse debe ser considerado como el grupo *B. Occidentalis* (Santos-Barrera, 1995). Los grupos o complejos de especies son conjuntos de especies o poblaciones que se agrupan tomando en cuenta la similitud morfológica y/o ecológica que guardan las especies, sin que ello signifique necesariamente que existen relaciones de

parentesco entre las mismas. Con frecuencia esa similitud general observada no nos dice mucho sobre la historia evolutiva de las unidades en cuestión, dejándolas como especies de posición taxonómica incierta o de difícil identificación y por lo tanto, clasificadas artificialmente por conveniencia. Hasta hace un par de décadas, esto era el resultado de la aplicación de conceptos biológico y polítipico de especie que no toman en cuenta la historia evolutiva de las unidades que clasifican, sino el grado de aislamiento reproductivo y la similitud fenotípica que existe entre las unidades a clasificar. En este trabajo se asume el uso del concepto evolutivo de especie propuesto por Simpson en 1969 y retomado por Wiley en 1978, que considera a las especies como las entidades más grandes que han evolucionado y cuyas partes, si se distinguen, probablemente no están en trayectorias filogenéticas diferentes (Frost y Hillis, 1990). Como todos los conceptos de especie propuestos, este concepto tiene algunos inconvenientes operacionales para su aplicación, como lo es el descubrimiento de las evidencias o caracteres que permiten recuperar la historia de esas entidades y definir las como linajes independientes. El análisis filogenético de diferentes conjuntos de caracteres puede ayudar a resolver esta situación y es aparentemente congruente con la naturaleza misma de los organismos.

*Bufo occidentalis* ha sido considerada como una especie monotípica por Blair (1963), mientras que Frost (en Mendelson III, 1997) la incluye dentro del grupo *B. valliceps*. Como en otros herpetozoos, la mayoría de los grupos de especies dentro del género *Bufo* se han formado por similitud en los caracteres de morfología externa y/u osteología, aunque no expresen las relaciones filogenéticas entre las especies (Mendelson III, 1997). En este trabajo propongo que se reconozcan tres nuevas especies dentro del grupo *B. occidentales*, las cuales, además de presentar una combinación única de caracteres (discontinuidades) son alopátridas con respecto al resto de las poblaciones de *B. occidentalis*.

Cuando se inició el estudio taxonómico de *Bufo occidentalis* se pensó en definir con claridad los límites de las especies que conforman este taxón, y de ser posible, proponer una hipótesis de las relaciones filogenéticas entre las especies descubiertas y sus especies cercanas al respecto, Blair (1963) pensaba que *B. occidentalis* podría estar

*cercanamente emparentado con B. bocourti por considerar que ambos habitaban en tierras altas y eran de algún modo, equivalentes ecológicos. Mendelson III (1997), realizó un estudio taxonómico basado en 45 caracteres de morfología general externa y osteología para definir la monofilia de las especies pertenecientes al grupo B. valliceps, y conocer la relación de este grupo con el resto de los Bufo de Norteamérica. Sus resultados muestran que B. occidentalis es el grupo hermano de B. americanus, especie que se distribuye en el sureste de Canadá y hacia el sur en el centro y este de Estados Unidos de América. Mendelson III (1997) sospecha entonces que B. occidentalis puede estar más relacionado con las especies norteamericanas que con las del sur de México. En un segundo grupo de especies relacionadas con el clado americanus-occidentalis, se encuentran varias especies que habitan en el sureste de México y Centroamérica, como B. marmoratus, B. bocourti, B. canaliciferus y B. ibarrae.*

*Algunos intentos por probar la monofilia de ciertos grupos de especies de Bufo han sido infructuosos. La mayor parte de estos estudios incluyen a uno o dos representantes de los diferentes grupos (Graybeal, 1993; Maxson, 1984; Mendelson III, 1997a) y no a la totalidad de las especies que conforman al grupo. Actualmente se acepta de manera general que la familia Bufonidae es un grupo monofilético apoyándose en los caracteres sinapomorfos los que a continuación se mencionan (resumidos por Ford y Cannatella, 1993): presencia del órgano de Bidder, la ausencia de dientes, el patrón de inserción particular del músculo hiogloso, la ausencia del músculo constrictor posterior, el origen del músculo depresor solo del escuamoso y el ángulo de orientación asociado del escuamoso y presencia del elemento ático. El género Bufo, el más diverso de esta familia, es también un enigma para los sistematas. Los datos moleculares provistos por Maxson (1984) y Graybeal (1993) no han podido demostrar que el género Bufo es un grupo monofilético y se especula que su origen puede ser polifilético.*

El advenimiento de las técnicas moleculares ha permitido dilucidar la taxonomía y las relaciones filogenéticas en un sinnúmero de especies y otros taxones. En este trabajo se seleccionó la técnica de electroforesis de enzimas utilizando el acetato de celulosa como sustrato. Esta técnica ha sido poco utilizada en herpetología y se piensa que puede presentar algunas

dificultades cuando se compara con la electroforesis en almidón de papa (Murphy, et al., 1996). Sin embargo, la técnica en acetato de celulosa es relativamente fácil de realizarse, ofrece resultados en un tiempo más corto y ha permitido resolver la identidad taxonómica de algunas poblaciones de anfibios (p. ej. Odendall, et al., 1983, ver Richardson, et al., 1986).

## MÉTODOS

Para el estudio morfológico se contó con una muestra de 731 ejemplares de *Bufo occidentalis* que incluían crías, jóvenes y adultos, procedentes de las diferentes poblaciones a lo largo de su distribución. Estos ejemplares están depositados en 26 diferentes colecciones herpetológicas de México, Estados Unidos de América e Italia. Estos ejemplares, de acuerdo con su localidad de recolecta se agruparon en poblaciones delimitadas geográficamente a las cuales se les asignó un número progresivo siguiendo una dirección norte-sur y nombrándose entonces como unidades geográficas operativas (UGO's), designadas así para fines del análisis morfométrico multivariado (Figura 1). Se definieron 22 UGO's a las que se les adicionó la UGO 23 que corresponde a ejemplares de *B. valliceps* introducido al análisis solo para fines de comparación de las UGO's definidas (1 y 10) no se tienen representantes, sin embargo existen los registros herpetológicos en colecciones, por lo que se tomó la decisión de numerarlas

Figura 1.- Localización geográfica de las 21 poblaciones (UGOs) definidas en este estudio en la distribución de *Bufo occidentalis*.



## I. MORFOLOGIA EXTERNA.

Para el análisis de caracteres de morfología externa se estudiaron 431 ejemplares adultos *de 8. occidentales*, de los cuales 235 son machos y 196 hembras, además de 300 jóvenes y crías. La taxonomía de este grupo *se basa* en la comparación de los caracteres morfológicos de los adultos, sin embargo los jóvenes y las crías se emplearon para describir la variación ontogenética de estos caracteres en las poblaciones de los 431 adultos examinados, 98 ejemplares fueron recientemente recolectados en el campo a lo largo de cinco diferentes salidas a los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Puebla, Tlaxcala y Oaxaca, en donde se visitaron más de veinte localidades encontrando organismos sólo en once de esas localidades.

Para el examen de la morfología externa se consideraron cuatro caracteres *principales en los cuales se observó variación entre las poblaciones. Los caracteres morfológicos, con sus respectivos estados de carácter se listan a continuación:*

- 1) Desarrollo y arreglo de las crestas cefálicas (ver Figura 2a).
  - a) Supraocular (SO), postocular (PO), y parietal (PR) conspicuas b) Solo 50 y PO evidentes, PR insinuada.
  - c) Solo 50 conspicua
- 2) Patrón de color en el dorso.
  - a) Numerosas manchas de tamaño pequeña y uniforme distribuidas en casi toda la superficie dorsal incluyendo los costados.
  - b) Manchas pequeñas y medianas oscuras sobre un fondo gris oscuro sobre el que se observan también numerosos puntos entre las manchas,
  - c) Manchas grandes oscuras llegando o no a formar una línea media clara, está línea con frecuencia está interrumpida.

3) Patrón de color en el vientre.

- a) Inmaculado
- b) Algunos puntos o pecas grises separados
- c) Manchas oscuras que en ocasiones se fusionan

4) Desarrollo y abundancia de los gránulos en el dorso

- a) Granos pequeños distribuidos uniformemente y en abundancia
- b) Granos casi todos del mismo tamaño de forma redonda poco abundantes c)  
Granos grandes de punta achatada, distribución escasa.
- d) Granos pequeños y medianos con punta casi redonda y una hilera costal en cada lado de granos medianos con terminación afilada.

Otros caracteres examinados en los cuales no se observó variación, comprenden el arreglo de la membrana interdigital en las extremidades posteriores y el patrón de manchas y granulación en las extremidades. La coloración de las superficies dorsales y ventrales se registró en las crías, los jóvenes y los adultos, utilizando códigos para cada color siguiendo la carta de colores de Smithe (1974).

#### ANÁLISIS DE LOS CARACTERES DE *MORFOLOGÍA* EXTERNA

Cada uno de los caracteres de morfología externa se codificó de acuerdo al estado de carácter que presenta en los ejemplares adultos examinados (Códigos arriba mencionados). Estos datos se guardaron en una base de datos con la que se construyeron histogramas de frecuencia de cada uno de los estados de carácter en las poblaciones.

Este estudio se restringió a ejemplares adultos que se suponían sexualmente maduros. Los machos sexualmente maduros en esta especie de sapos muestran, como otras especies de anuros excrecencias nupciales en los dos o tres primeros dedos de las manos las cuales suelen teñirse de color café oscuro. Si existía duda sobre el sexo, se examinaba la boca en busca de las aberturas de los sacos guiales, ubicados a uno u otro lado del piso bucal,

junto a la lengua. Las hembras *pueden distinguirse* porque son generalmente muy corpulentas, son de talla más grande que los machos. Solamente en los casos en los que estos caracteres no eran claros se empleaba el examen de las gónadas.

#### MORFOMETRÍA:

Las variables morfométricas consideradas aquí son las frecuentemente empleadas en sistemática de Bufónidos (ver Figura 2a y 2b, Morrison, 1991; Mendelson III, 1997a, 1997b, 1997c). Todas las variables se obtuvieron utilizando un vernier electrónico (MITUTOYO- Serie 300) con una precisión de 0.1 mm.

- 1) Longitud hocico-cloaca (LHC). Es la medida comprendida entre la punta del hocico y el borde externo del orificio anal.
- 2) Largo de la cabeza (LC). Medido desde el extremo posterior de la cabeza en diagonal hacia la punta del hocico.
- 3) Ancho de la cabeza (AC). Medida entre los extremos laterales de la cabeza por detrás de la mandíbula.
- 4) Largo de la tibia (LT). Medida entre la rodilla y el borde anterior del tarso. 5) Diámetro máximo del tímpano (TIMP). Diámetro más largo del tímpano, si es ovalado.
- b) Largo del párpado (PAPP). Distancia entre uno y otro extremos internos del párpado.
- 7) Largo de la parotoide (PAROT),
- 8) Distancia interorbital (DIO). Distancia entre los dos extremos interiores de los ojos.
- 9) Distancia nostrilo-hocico (DHN). Distancia entre la punta del hocico y el nostrilo 10) Distancia nostrilo-ojo (DNQ). Distancia entre el nostrilo derecho y el borde interno del ojo derecho.

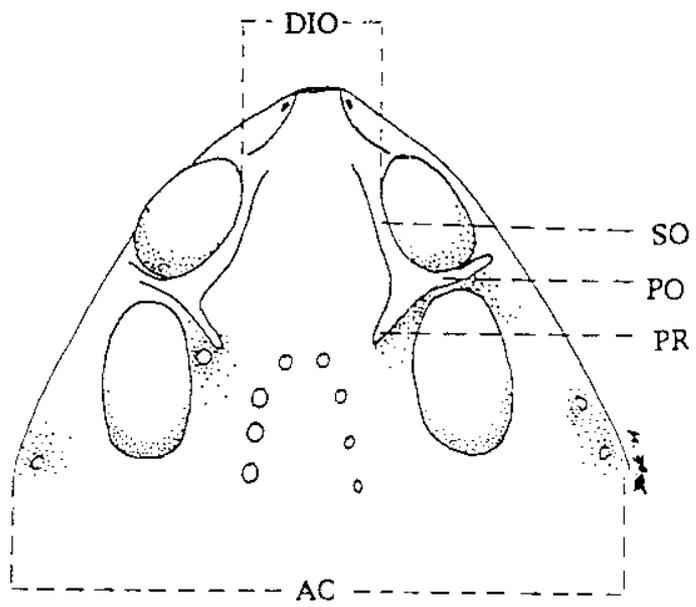


Figura 2c.- Caracteres *de morfología* externa estudiados en 10 poblaciones de *Bufo occidentales\_*

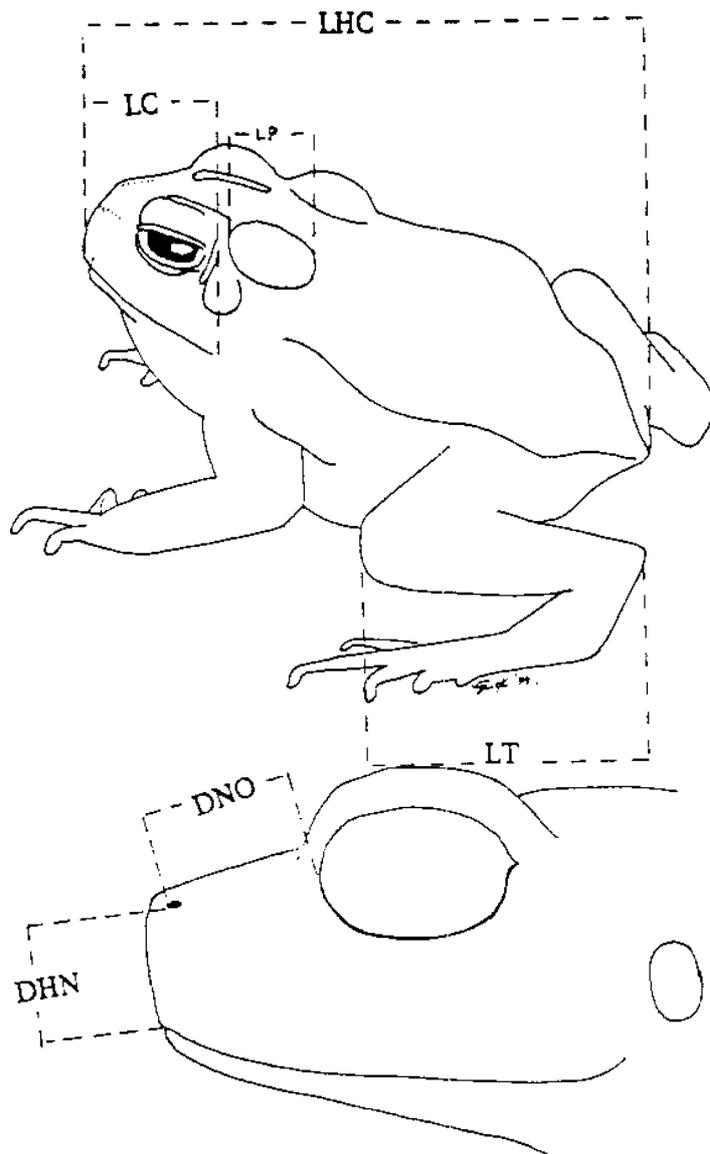


Figura 2b.- Caracteres de morfometría externa estudiados en 10 poblaciones de *Bufo accidentalis*. Ver texto para explicación de las abreviaturas.

## ANALISIS DE LOS CARACTERES MORFOMETRICOS:

Cada uno de los valores  $\gamma$  se almacenó en una matriz de datos mediante el programa computacional EXCEL (versión 7.0). Todos los análisis estadísticos se hicieron utilizando el programa computacional JMP Versión 3.1.6.2 (Sal; y Lehmann, 1991). Una vez demostrado que las diez variables tienen un comportamiento normal (prueba de normalidad), se realizó una regresión lineal en cada una de las variables por separado para obtener los valores conocidos como residuales, que son los valores de ajuste de cada variable a la recta en la regresión. Esta prueba se hizo para corregir el error introducido al considerar en el estudio ejemplares adultos de distintas edades, ya que el crecimiento en las especies del género *Bufo es* indeterminado. Con los residuales se realizó una prueba de componentes principales (ACP) para conocer si las muestras se agrupaban geográficamente. Los valores de las tres primeros componentes se graficaron 1 vs. 2 y 1 vs. 3, respectivamente utilizando el programa Cricket Graph Version 1.3 para Macintosh.

## II. ELECTROFORESIS DE ENZIMAS.

Se utilizaron 191 muestras de tejidos de ejemplares de sapos pertenecientes a ocho especies del género *Bufo* y que fueron recolectados en diferentes salidas al campo. De estos, 94 fueron recolectadas ex profeso para este estudio. Los ejemplares adultos de sapos se identificaban en el campo y disecaban para extraer muestras de tejidos de los órganos hígado, estómago-intestino y músculo esquelético. Estas muestras se colocaron en criotubos rotulados con el número de recolecta y la especie y se guardaron en un tanque de nitrógeno líquido para transportarlos al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se guardaron en un ultracongelador (REVCO) a  $-72$  C. Se obtuvieron muestras frescas de 9 de las 21 poblaciones de *B. occidentalis* y 41 muestras de las siete especies utilizadas como grupos externos. En total se analizaron 162 individuos ya que en nueve de los tejidos con que se contaba al inicio las enzimas no mostraron actividad y se tuvieron que deshechar, Todos los ejemplares recolectados

se depositaron en la colección herpetológica del Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM (MZFC). La técnica empleada para el análisis de enzimas es la electroforesis en geles de acetato de celulosa, siguiendo los protocolos de Herbert y Beaton (1993) y Richardson et al., (1986).

De cada una de las muestras de tejidos se separó un fragmento de músculo esquelético e hígado y se depositaron en morteros de porcelana limpios, a esta muestra se adicionó un volumen aproximado de 50 ml de nitrógeno líquido moliéndose el fragmento inmediatamente con el mango de porcelana para pulverizarlo, cuando el nitrógeno se evaporó se adicionaron 200 ul del buffer de extracción Tris EDTA Mercaptoetanol pH: 7.0. Este producto se vació en tubos eppendorf limpios y se centrifugó por 5 minutos a 1500 PVP. Los tubos con el sobrenadante de cada muestra se congelaron nuevamente a -71 C. Para realizar la electroforesis se tomó una fracción de aproximadamente 8 l de cada muestra con la micropipeta y se depositó en los pozos especiales dentro de la placa de carga del equipo para electroforesis en acetato de celulosa (Helena Laboratories, 1993). Cuando se completó el llenado de los 12 u 11 pozos se realizó la aplicación de la muestra en la lámina de acetato de celulosa utilizando el aplacador o peine para recoger la muestra provisto en el equipo. En cada gel se aplicaron normalmente 11 muestras numeradas. En los carriles 1 y 11 y 1 y 12 se cargó una muestra de la cual se conocía el patrón de bandas para que funcionara como marcador. Cada gel con las muestras cargadas se colocó en la cámara de electroforesis para acetatos de celulosa (Modelo 4063, Helena Laboratories), la cual contenía ya la solución amortiguadora para la corrida. Para permitir el paso de la corriente se utilizaba papel filtro absorbente como enlace entre la solución amortiguadora y la lámina de acetato *de celulosa*. Las muestras se corrieron durante 60 ó 90 minutos a 120-140 Volts y 10 mA, Después de ese tiempo se los geles se tiñeron utilizando los protocolos *especiales* por a cada una de las enzimas a evidenciar (Herbert y Beaton, 1993). Las condiciones electroforéticas para cada una de las enzimas se resumen en el Cuadro 1. Una vez terminada la reacción se lavaron los geles en agua corriente para eliminar la capa de agar.

Cada uno de los geles se fotografió y archivó utilizando el programa computacional QVLink versión 1.2.3 para Macintosh. Los datos de la electroforesis se leyeron siguiendo el criterio de movilidad de las bandas para definir los diferentes electromorfos. Éstos se designaron con números en secuencia progresiva 1, 2, 3, etc. de acuerdo a la movilidad catódo-ánodo. La última banda o la más móvil se designó como 1, la siguiente 2, y así sucesivamente. La movilidad de las bandas se registró además midiendo la distancia alcanzada en milímetros a partir del origen, es decir en donde se colocó la carga de proteínas.

Cuadro 1. Enzimas ensayadas en 10 poblaciones de *S. occidentalis* y seis especies más de *Bufo* y condiciones electroforéticos. Amortiguadores: J pH 8.2 ; CA APM: Acido cítrico aminopropil morfolina pH: 8.5; Tejidos. a: hígado, b: músculo esquelético. CE, Número de la Comisión Internacional de Enzimas

Enzima	Locus	No. CE	Buffer	Tejido
1) Aconitato hidratasa	ACON 1	4,2,1,3	CAAPM	A
	ACON 2			
2) Alanin am inotranférasa	AAT		J	A
3) Esterasa	EST	3.1.1,1	CAAPM	A
4) Fosfoglutamato deshidrogenasa	6PGDH1	1.1,1.44	CAAPM	a
	6PGDH2			
5) Fumarato hidratasa	FUMH	4.2.1.2	J	A
6) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6PDH1	1.1.1.49	CAAPM	a, b
	G6PDH2			
7) Glucoseofosfeto isomerasa	PGI1	5.3.1.9	J	a, b
	PGI2			
8) Isocitrato deshidrogenasa	IDH 1	1.1.1.42	J	a,b
	IDH 2			
9) Lactato deshidrogenasa	LDH	1.1.1.27	TG, CAAPM	a, b
10) Malato deshidrogenasa NADP	ME1	1.1.1.40	J	a,
	ME2			
	ME3			

## RESULTADOS

### I. MORFOLOGÍA EXTERNA

La distribución de los cuatro caracteres de morfología externa dentro de las diferentes poblaciones de *Bufo occidentales* se ha resumido en los histogramas de frecuencias para cada carácter en cada población, (Figs. 3-17). Puede notarse que la especie *g occidentalis*, en conjunto es muy variable morfológicamente entre poblaciones y también entre los dos sexos. En lo que respecta al desarrollo de las crestas cefálicas podemos decir que existen pocas diferencias. En los machos de las poblaciones estudiadas es más frecuente encontrar el arreglo de las crestas donde la 50, la Pr y la PO son conspicuas, aunque si existen individuos en donde solo la Pr y la PO son evidentes. En lo que respecta a las hembras, es más frecuente encontrar organismos en donde las tres crestas, So, PO y Pr son evidentes, el segundo y tercer arreglos frecuentes son el de la 50 sola y la So y la Pr conspicuas.

En lo que respecta al patrón de manchas en el dorso, podemos decir que este carácter varía relativamente poco dentro de las poblaciones y más entre las poblaciones. El arreglo de las manchas grandes y medianas que pueden llegar a formar dos bandas paravertebrales es el más común en ambos sexos, salvo por la población 12, en donde las manchas dorsales son pequeñas, casi redondas y *distribuidas* de manera uniforme en la superficie dorsal,

El vientre en casi todos los organismos está immaculado, a excepción de la población 18, donde la condición que prevalece es el vientre con manchas o puntos de color negro o gris, al menos en el primer tercio de la superficie ventral, Puede distinguirse aquí la población 16, constituida exclusivamente por machos, en donde es evidente que el vientre está fuertemente manchado de negro o café oscuro en el 100 % de la muestra examinada. Esta característica es exclusiva de esta población que habita en la porción norte del estado de Puebla, cerca de Huauchinango.

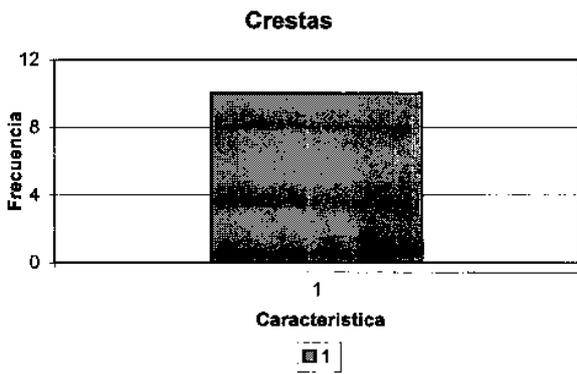
Finalmente, en lo que respecta a la granulación en las superficies dorsales, es claro que la presencia de granos grandes y medianos poco abundantes es la condición más

frecuente, sin embargo, debe distinguirse la población 2, constituida exclusivamente por machos posee predominantemente granos de pequeño *tamaño en* forma abundante y un informe, además de presentar manchas dorsales redondas y pequeñas. La combinación de estos dos caracteres ha permitido diferenciarla del resto de las poblaciones y proponerla como un candidato a ser una nueva especie, por lo menos en lo que a morfología externa se refiere. Asimismo, la población 18 muestra un arreglo de granos grandes y espinosos con una hilera costal de granos medianos a cada lado del cuerpo en ambos sexos. La presencia de este carácter, aunado a la coloración y aspecto general del cuerpo ha permitido separar también esta población del resto.

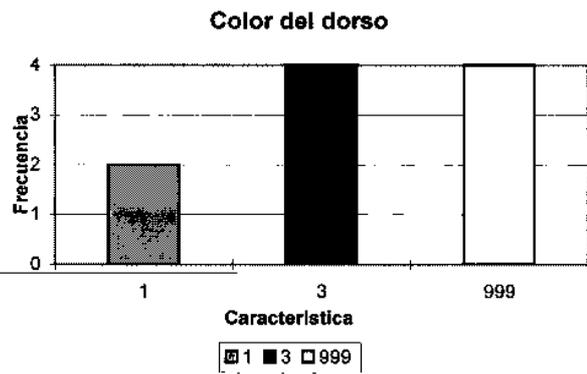
#### MORFOMETRÍA.

El estudio de las diferentes variables morfométricas de *a occidentalis* siguiendo un método de estadística multivariada revela que no existen diferencias intrasexuales de tamaño y forma en los organismos medidos. El análisis de componentes principales revela que no pueden distinguirse las poblaciones utilizando el tamaño y la forma de las diferentes partes del cuerpo. Cuando se grafican los valores del componente 1 contra el componente 2 de cada uno de los dos sexos, se observa que forman una nube única en donde todos los organismos de las diferentes poblaciones se mezclan entre sí (ver Figura 18a y b). Esto significa de manera general que no existen diferencias en forma y tamaño del cuerpo en los individuos de las diferentes poblaciones, aún cuando se consideran ejemplares jóvenes y viejos a la vez

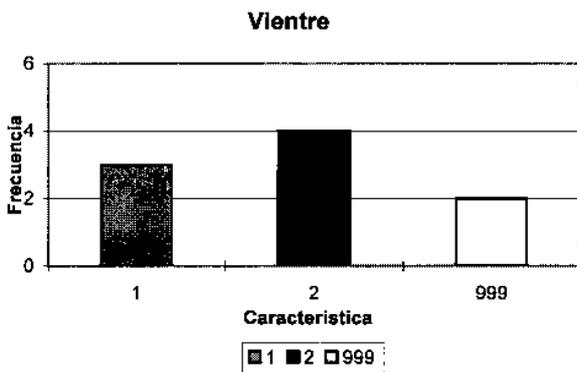
**Figura. 3. Distribución de los caracteres: Crestas, Color dei dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 2 de *Bufo accidentalis***



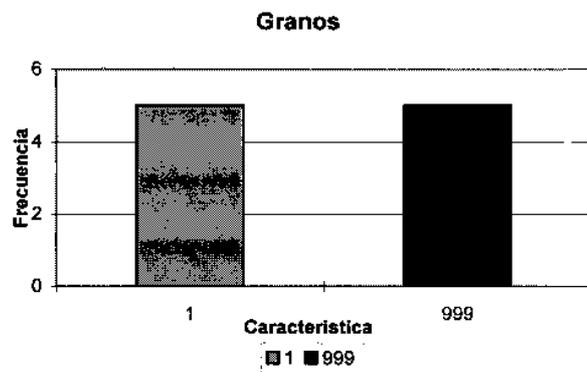
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	10
<b>Total</b>	<b>10</b>



Dorso	
Característica	Frecuencia
1	2
3	4
999	4
<b>Total</b>	<b>10</b>

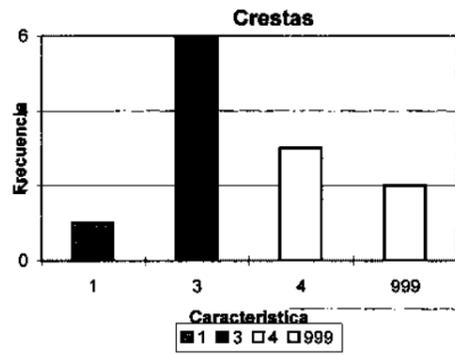


Ventre	
Característica	Frecuencia
1	3
2	4
999	2
<b>Total</b>	<b>9</b>

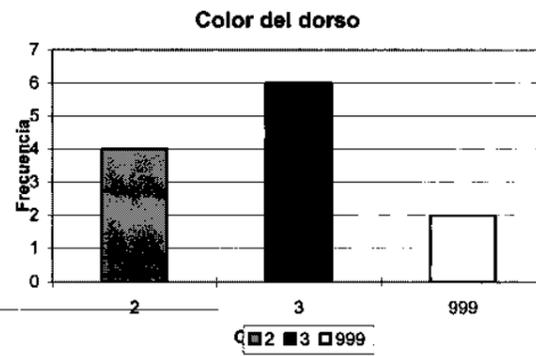


Granos	
Característica	Frecuencia
1	5
999	5
<b>Total</b>	<b>10</b>

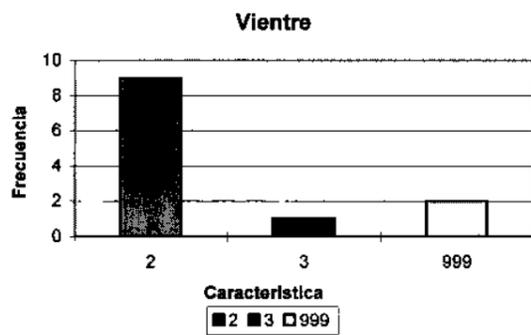
Figura 4.- Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 5 de *Bufo occidentales*



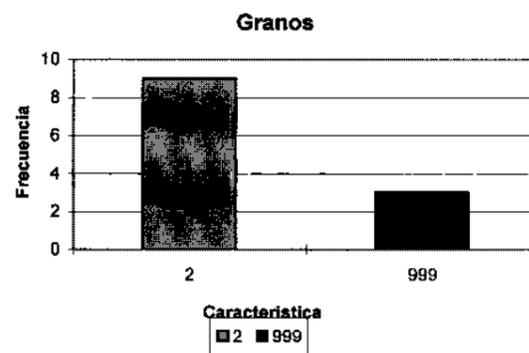
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	1
3	6
4	3
999	2
<b>Total</b>	<b>12</b>



Dorso	
Característica	Frecuencia
2	4
3	6
999	2
<b>Total</b>	<b>12</b>

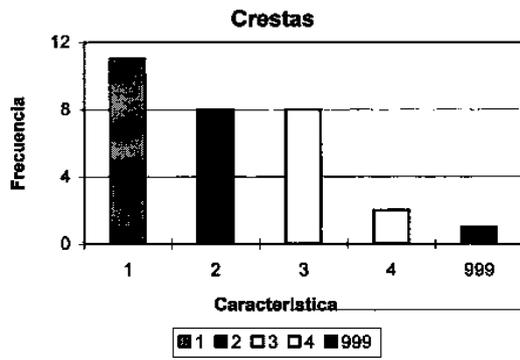


Vientre	
Característica	Frecuencia
2	9
3	1
999	2
<b>Total</b>	<b>12</b>

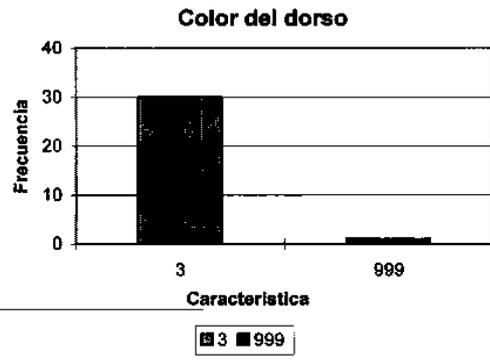


Granos	
Característica	Frecuencia
2	9
999	3
<b>Total</b>	<b>12</b>

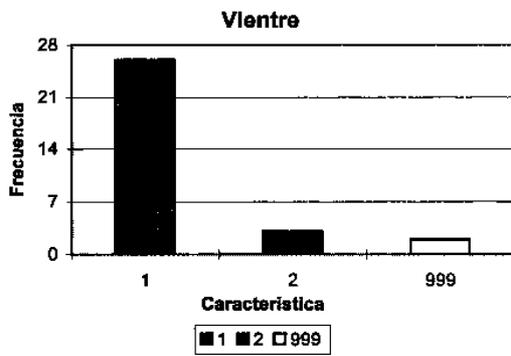
Figura 5.- Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 8 de *Bufo occidentales*



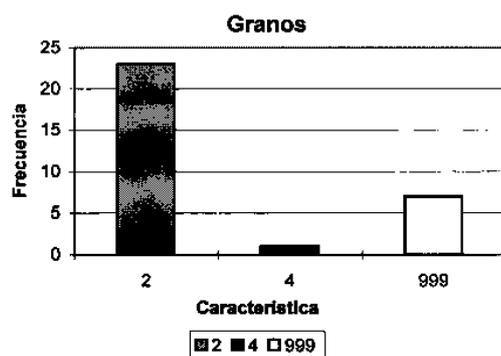
Característica	Frecuencia
1	11
2	8
3	8
4	2
999	1
<b>Total</b>	<b>30</b>



Característica	Frecuencia
3	30
999	1
<b>Total</b>	<b>31</b>

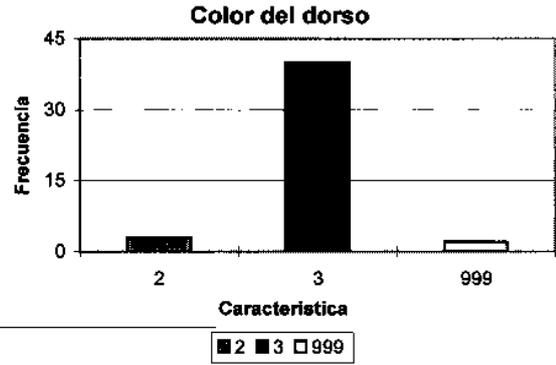
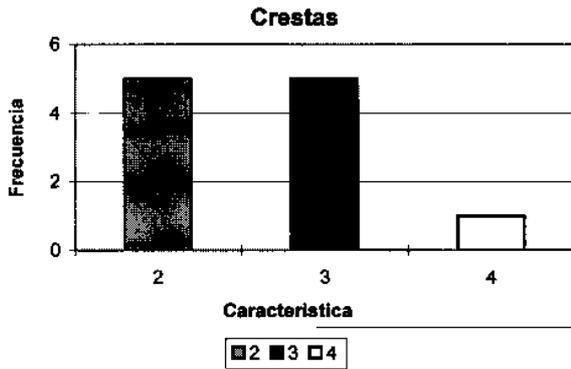


Característica	Frecuencia
1	26
2	3
999	2
<b>Total</b>	<b>31</b>



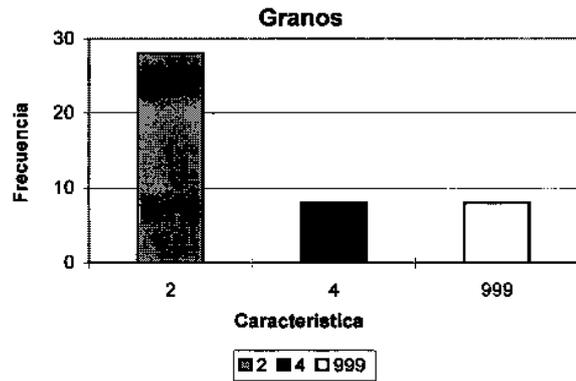
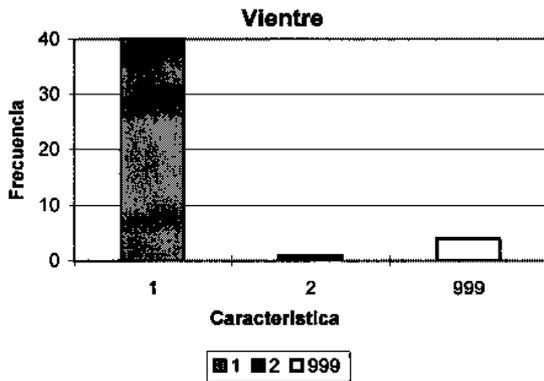
Característica	Frecuencia
2	23
4	1
999	7
<b>Total</b>	<b>31</b>

Figura 6.- Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 11 de *Bufo occidentalis*



Crestas	
Característica	Frecuencia
1	7
2	5
3	5
4	1
<b>Total</b>	<b>18</b>

Dorso	
Característica	Frecuencia
2	3
3	40
999	2
<b>Total</b>	<b>45</b>



Vientre	
Característica	Frecuencia
1	40
2	1
999	4
<b>Total</b>	<b>45</b>

Granos	
Característica	Frecuencia
2	28
4	8
999	8
<b>Total</b>	<b>44</b>

Figura 7.- Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 12 de *Bufo occidentales*

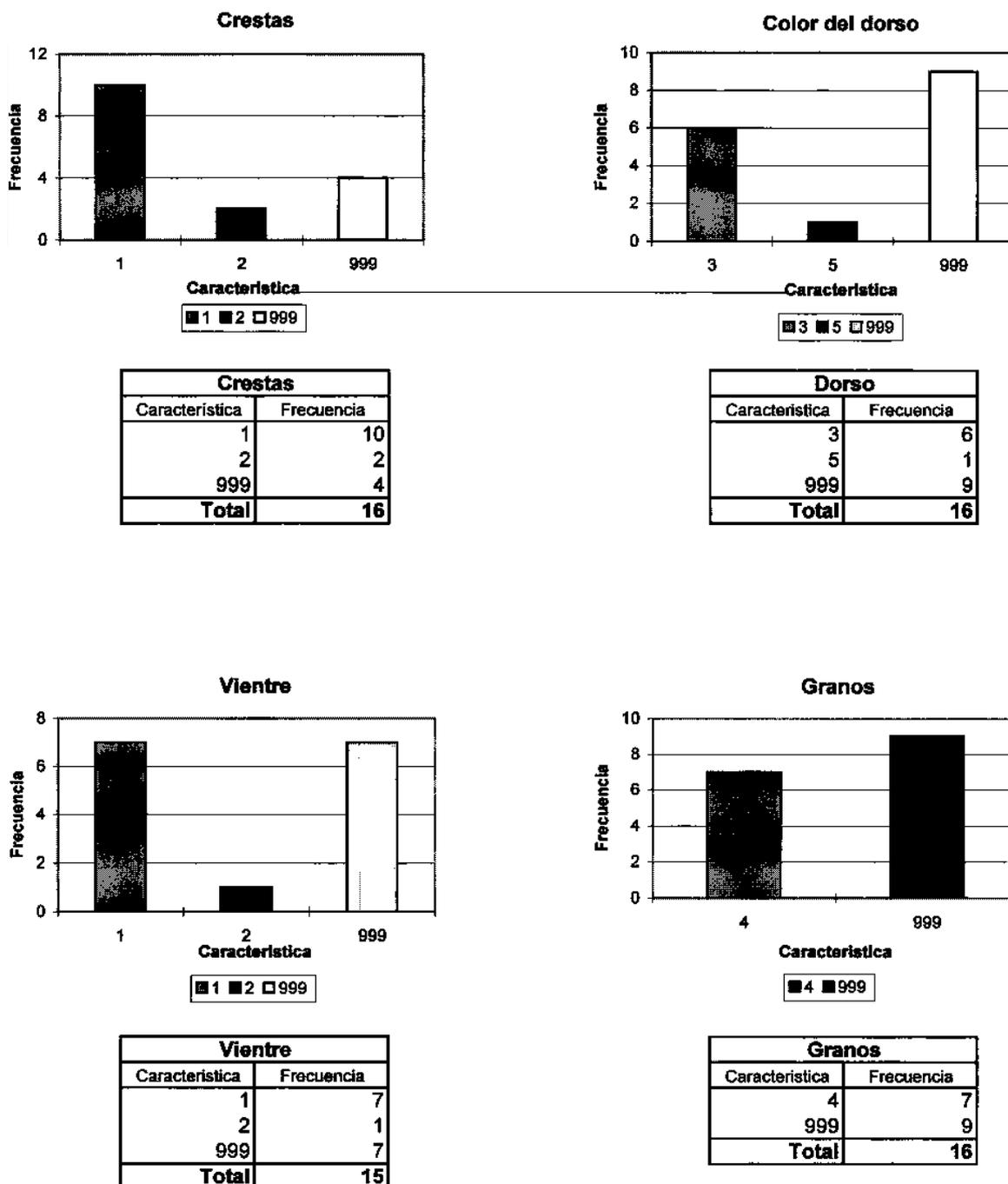
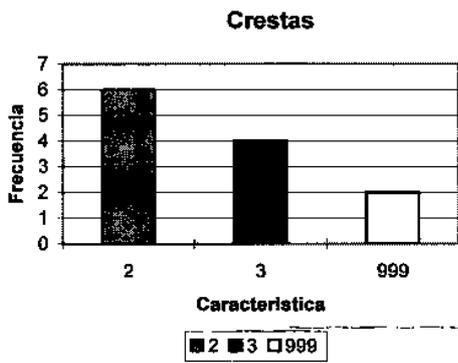
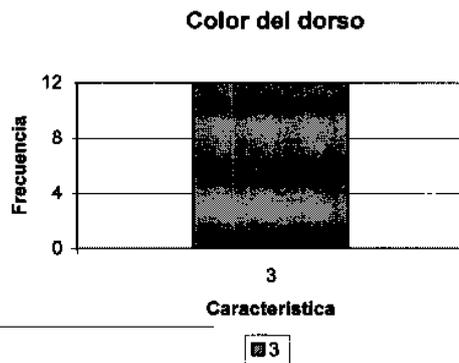


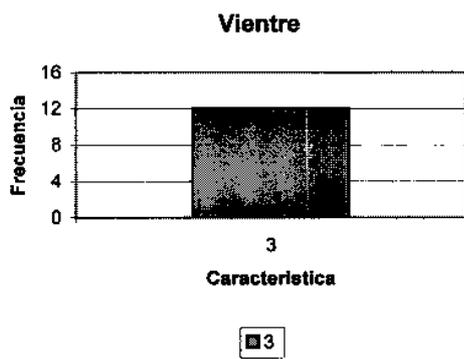
figura 8.- Distribución de los *caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre* y Granulación dors en la población de machos número 16 de *Bufo occidentales*



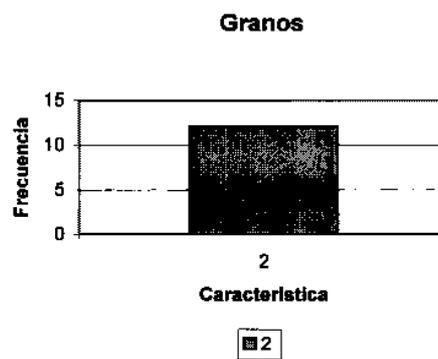
Crestas	
Característica	Frecuencia
2	6
3	4
999	2
<b>Total</b>	<b>12</b>



Dorso	
Característica	Frecuencia
3	12

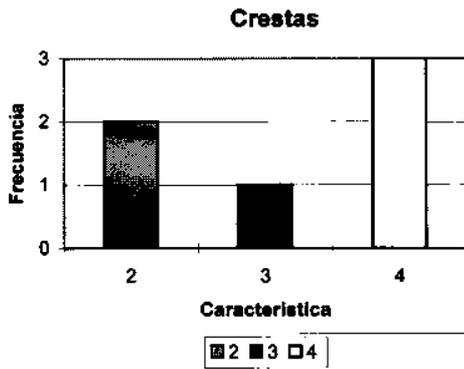


Vientre	
Característica	Frecuencia
3	12
<b>Total</b>	<b>15</b>

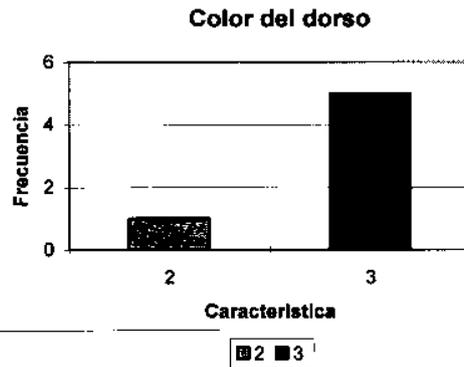


Granos	
Característica	Frecuencia
2	12
<b>Total</b>	<b>12</b>

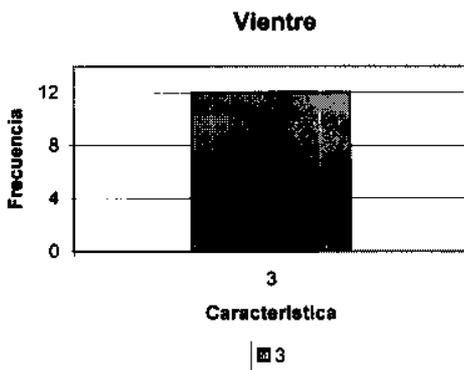
Figura 9.- Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 17 de *Bufo occidentalis*



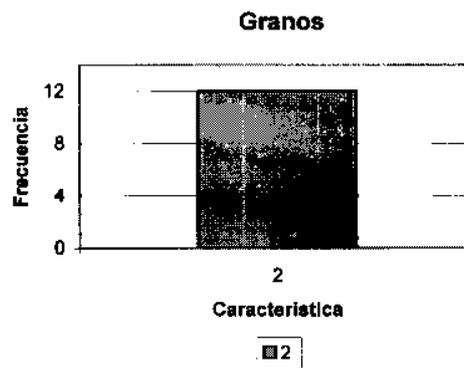
Crestas	
Característica	Frecuencia
2	2
3	1
4	3
<b>Total</b>	<b>6</b>



Dorso	
Característica	Frecuencia
2	1
3	5
<b>Total</b>	<b>6</b>

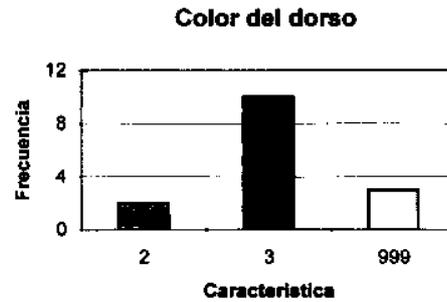
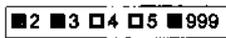
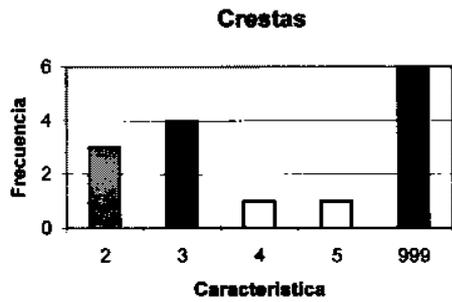


Vientre	
Característica	Frecuencia
3	12
<b>Total</b>	<b>12</b>



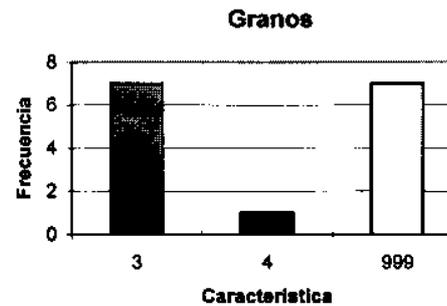
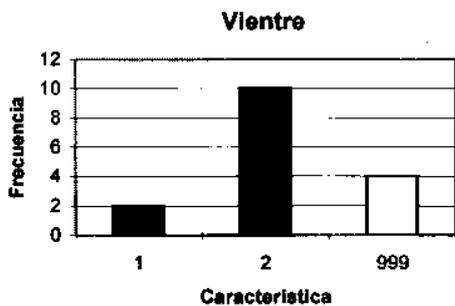
Granos	
Característica	Frecuencia
2	12
<b>Total</b>	<b>12</b>

Figura 10.- Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 18 de *Bufo occidentalis*



Crestas	
Característica	Frecuencia
2	3
3	4
4	1
5	1
999	6
<b>Total</b>	<b>15</b>

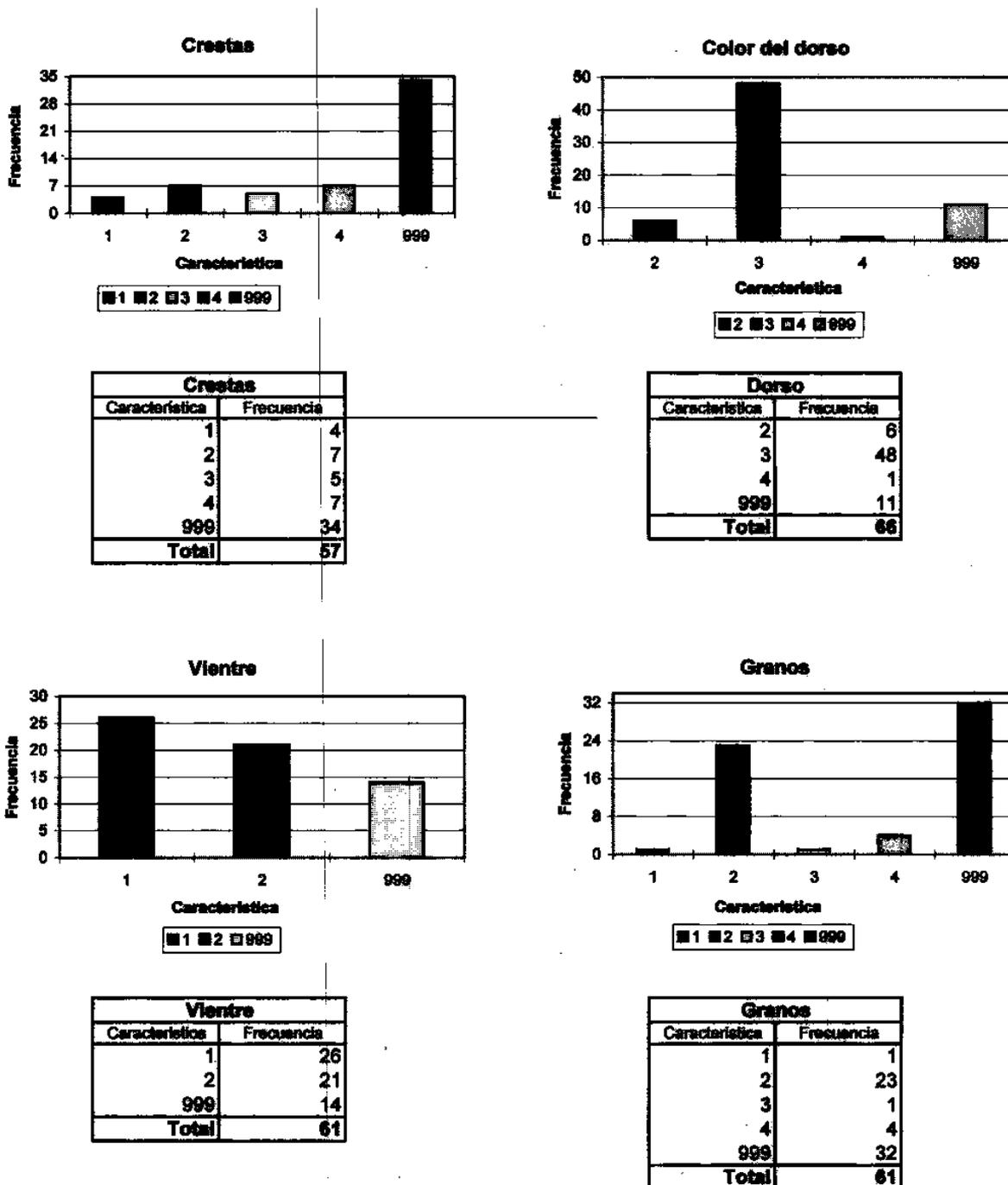
Dorso	
Característica	Frecuencia
2	2
3	10
999	3
<b>Total</b>	<b>15</b>



Vientre	
Característica	Frecuencia
1	2
2	10
999	4
<b>Total</b>	<b>16</b>

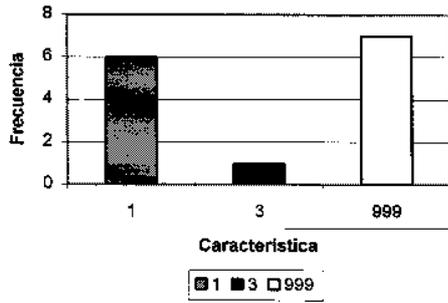
Granos	
Característica	Frecuencia
3	7
4	1
999	7
<b>Total</b>	<b>15</b>

Figura 11.- Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de machos número 21 de *Bufo accidentalis*



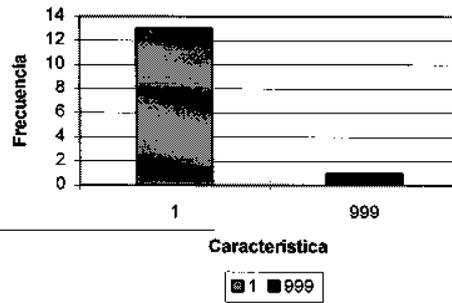
Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de hembras número 2 de *Bufo occidentalis*

**Crestas**



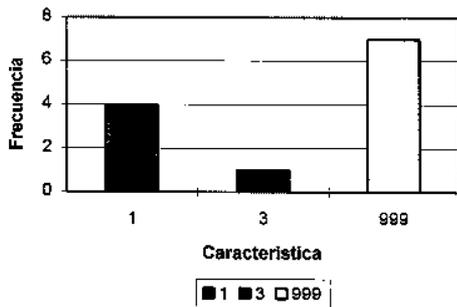
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	6
3	1
999	7
<b>Total</b>	<b>14</b>

**Color del dorso**



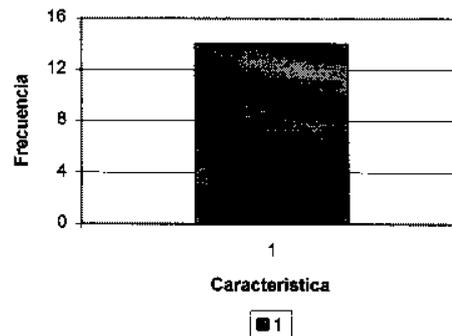
Dorso	
Característica	Frecuencia
1	13
999	1
<b>Total</b>	<b>14</b>

**Vientre**



Vientre	
Característica	Frecuencia
1	4
3	1
999	7
<b>Total</b>	<b>12</b>

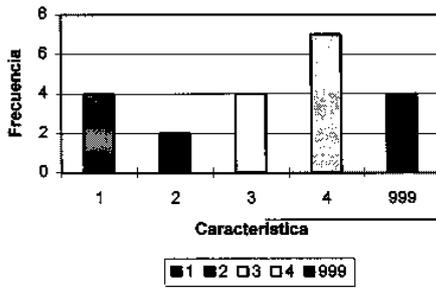
**Granos**



Granos	
Característica	Frecuencia
1	14
<b>Total</b>	<b>14</b>

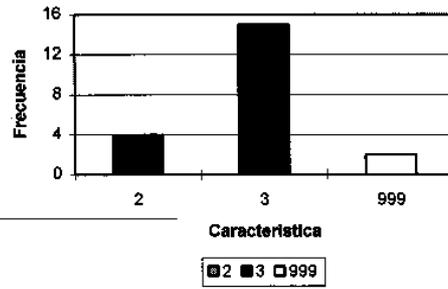
Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de hembras número 8 de Bufo occidentales

**Crestas**



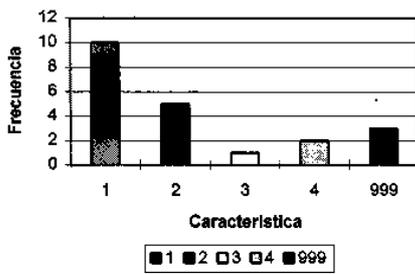
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	4
2	2
3	4
4	7
999	4
<b>Total</b>	<b>21</b>

**Color del dorso**



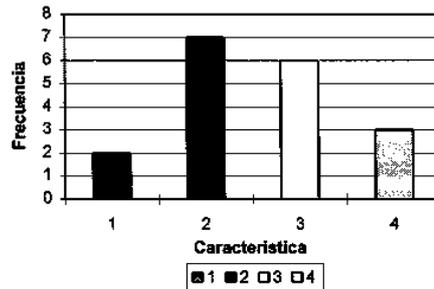
Dorso	
Característica	Frecuencia
2	4
3	15
999	2
<b>Total</b>	<b>21</b>

**Vientre**



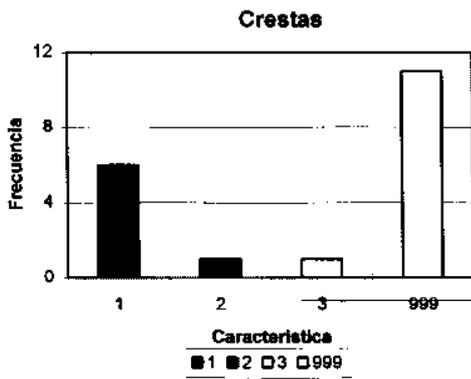
Vientre	
Característica	Frecuencia
1	10
2	5
3	1
4	2
999	3
<b>Total</b>	<b>21</b>

**Granos**

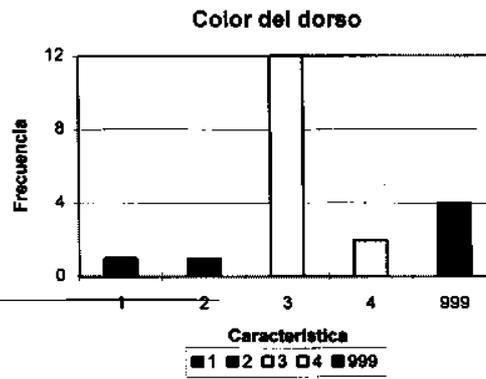


Granos	
Característica	Frecuencia
1	2
2	7
3	6
4	3
<b>Total</b>	<b>21</b>

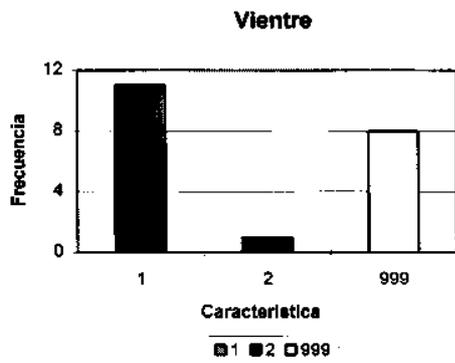
Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de hembras número 11 de Bufo occidentalis



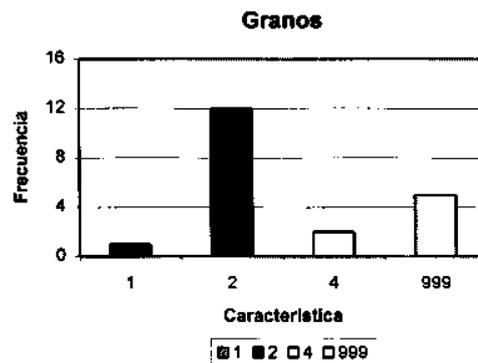
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	6
2	1
3	1
999	11
<b>Total</b>	<b>19</b>



Dorso	
Característica	Frecuencia
1	1
2	1
3	12
4	2
999	4
<b>Total</b>	<b>19</b>

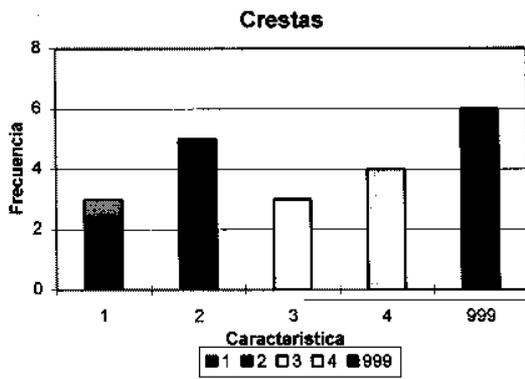


Vientre	
Característica	Frecuencia
1	11
2	1
999	8
<b>Total</b>	<b>20</b>

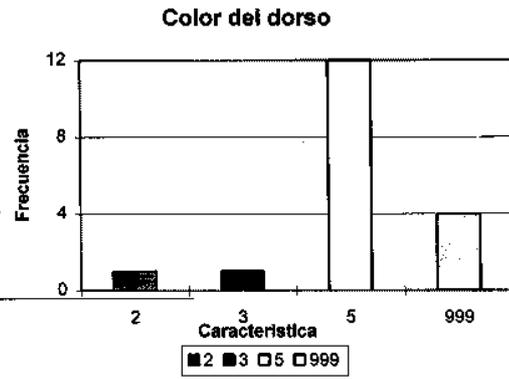


Granos	
Característica	Frecuencia
1	1
2	12
4	2
999	5
<b>Total</b>	<b>20</b>

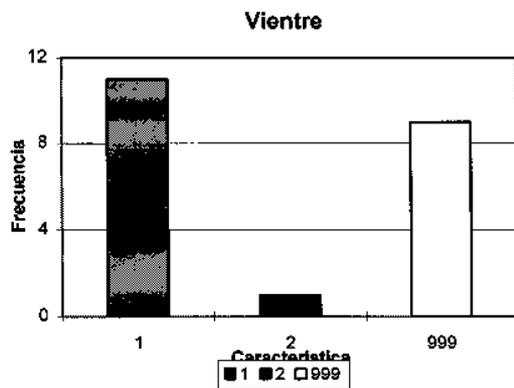
Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de hembras número 12 de *Bufo occidentalis*



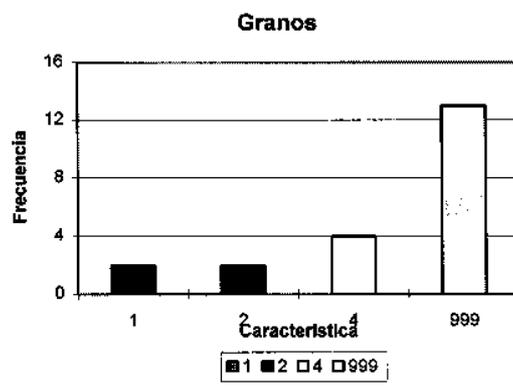
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	3
2	5
3	3
4	4
999	6
<b>Total</b>	<b>21</b>



Dorso	
Característica	Frecuencia
2	1
3	1
5	12
999	4
<b>Total</b>	<b>18</b>



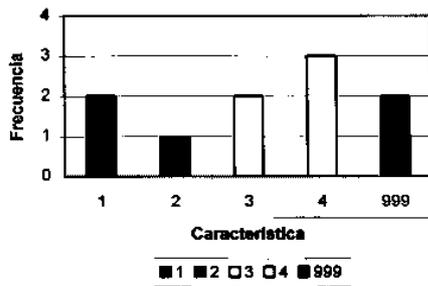
Vientre	
Característica	Frecuencia
1	11
2	1
999	9
<b>Total</b>	<b>21</b>



Granos	
Característica	Frecuencia
1	2
2	2
4	4
999	13
<b>Total</b>	<b>21</b>

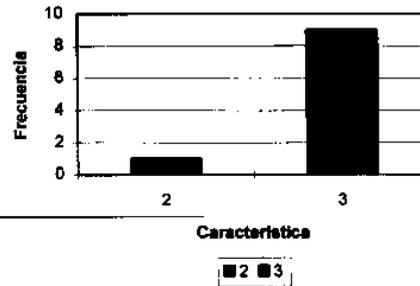
Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de hembras número 18 de Bufo *occidentalis*

**Crestas**



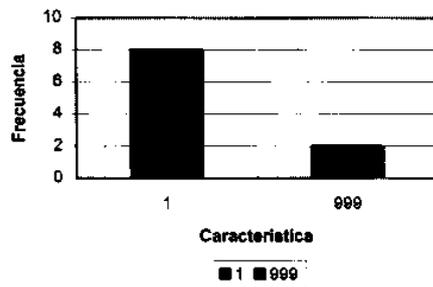
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	2
2	1
3	2
4	3
999	2
<b>Total</b>	<b>10</b>

**Color del dorso**



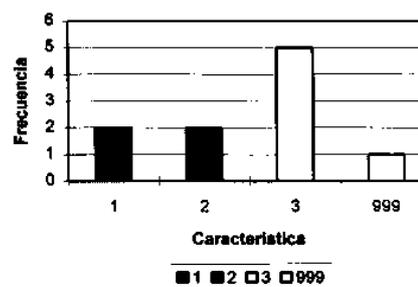
Dorso	
Característica	Frecuencia
2	1
3	9
<b>Total</b>	<b>10</b>

**Ventre**



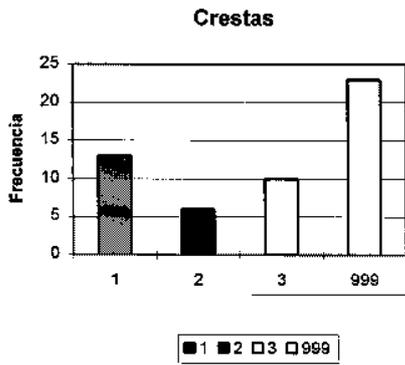
Ventre	
Característica	Frecuencia
1	8
999	2
<b>Total</b>	<b>10</b>

**Granos**

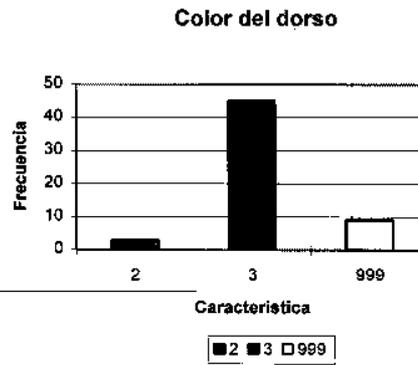


Granos	
Característica	Frecuencia
1	2
2	2
3	5
999	1
<b>Total</b>	<b>10</b>

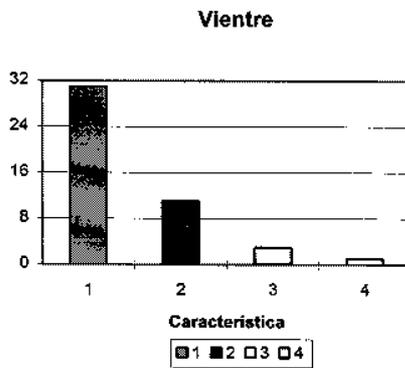
Distribución de los caracteres Crestas, Color del dorso, Color del vientre y Granulación dorsal en la población de hembras número de 21 de Bufo occidentales



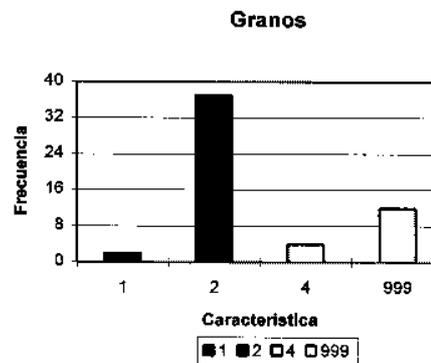
Crestas	
Característica	Frecuencia
1	13
2	6
3	10
999	23
<b>Total</b>	<b>52</b>



Dorso	
Característica	Frecuencia
2	3
3	45
999	9
<b>Total</b>	<b>57</b>



Ventre	
Característica	Frecuencia
1	31
2	11
3	3
4	1
999	14
<b>Total</b>	<b>18</b>



Granos	
Característica	Frecuencia
1	2
2	37
4	4
999	12
<b>Total</b>	<b>55</b>

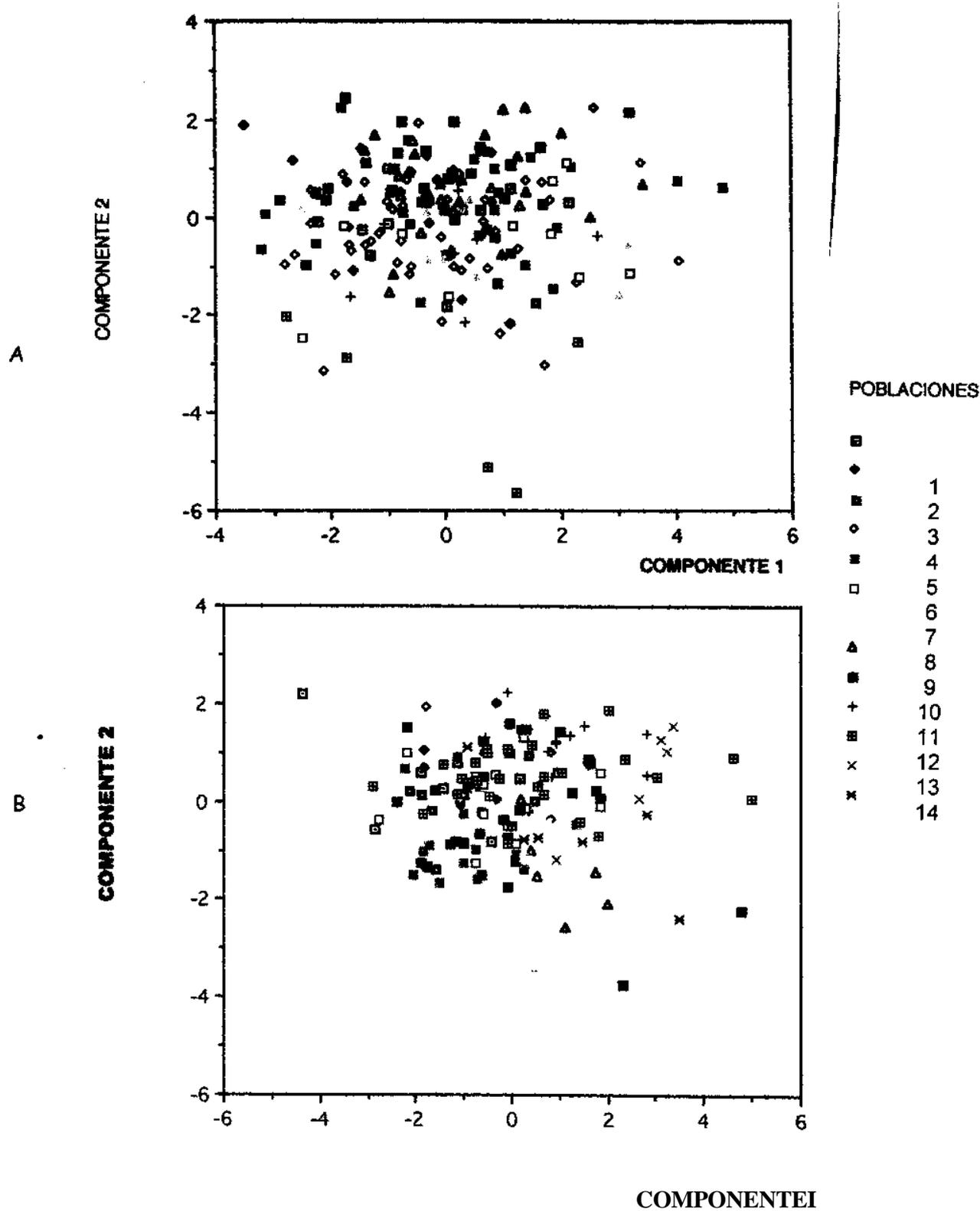


Figura 18. Gráficas de los componentes principales 1 vs. 2 de nueve variables de morfometría externa en 15 poblaciones de *Bufo accidentalis*. A) machos, B) hembras. No se muestra la gráfica de los componentes 1 vs. 3 por no tener relevancia.

## II. ELECTROFORESIS DE ENZIMAS

Los resultados de la electroforesis de enzimas (genotipos) en las poblaciones de *Bufo occidentales* se han resumido en el Cuadro 2. Se obtuvieron datos de 17 loci en 10 de poblaciones diferentes de *B. accidentalis* y siete especies más también del género *Bufo*. En primer lugar debe destacarse que existe una gran variabilidad genotípica

dentro de *B. occidentales*. La única enzima que resultó monomórfica para todas las poblaciones de *B. accidentalis* y para las otras especies es ACON-1aa. La población más variable es la que habita en Zacatecas y Aguascalientes en donde aparecen varios electromorfos exclusivos en las enzimas: Esterasa (EST<sup>1</sup>), (EST<sup>dd</sup>) que se encontraron también en *B. cinnaliferus* y en *B. valliceps*, respectivamente pero no en alguna otra población de *B. occidentales*. Los otros tres electromorfos exclusivos de la población AGS-ZAC son IDH<sup>1</sup>, G6PDH-2<sup>bb</sup> y FUM<sup>1</sup>. La única población en donde se registró también este genotipo es *B. punctatus*.

Existen otras poblaciones de *B. occidentales* en donde se registró la presencia de electromorfos exclusivos, estas son: burango, en donde se encontró IDH-1<sup>b</sup> e IDH-1c<sup>d</sup>; la población del centro de México, EMGHQ en donde se registró ACON-2 ad; Sur de Puebla, registrándose PGI-2ac<sup>1</sup>; Mchoacán (MICH) en donde se presentó IDH-2cc y las Tierras altas de Guerrero en donde se registró PGI-1aa. Debe hacerse notar que en las poblaciones EMGHQ y MICH los tamaños de muestra son relativamente pequeños, sin embargo los electromorfos exclusivos se registraron solo en *B. cagnatus* (IDH-2").

Cuadro 2.- Genotipos presentes en 17 loci de 10 poblaciones de *Bufo occidentales*, *j9 marmoreus* (MARMO), *B. bocourti* (BOCUR), *B. woodhousei* (WOOD) *B. canaliferus* (CANAL), *9. punctatus* (PUNC), *i?. valliceps* (VALLI), *B. cognatus* (COGN) en México. Poblaciones: AGS-ZAC, Aguascalientes y Zacatecas; CHIH, Chihuahua; bGO, Durango; OAX, Oaxaca; PUE-S, Sur de Puebla; EMGHQ, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo y Querétaro. GRO, tierras altas de Guerrero; MICH, Michoacán; TLAX, Tlaxcala: GROb, Tierras bajas de Guerrero. Los números entre paréntesis indican el número de organismos con el genotipo indicado.

LOCUS	AGS-ZAC	CHIH	DGO	OAX	PUE-S	EMGHQ	GRO	MICH	TLAX	GROb	MARMO	BOCUR	WOOD	CANAL	PUNC	VALLI	COGN
EST	bb (1) cc (2) dd (2) bc (4) bd (2) ab (1) ad (3) ac (2)	bd (3)	bb (3) cc (4) bc (2)	bb (6) cc (4) bc (2)	bb (1) cc (9) bc (1) bd (1)	bb (2) bc (2) ac (1) ad (1)	bc (1) cc (1)	ab (2)	Cc (1)	Ab	bb (1) dd (2) bd (6) be(1)	bb (3)		Aa (1) Bb (1) Cc (2) Dd (1) Ac (1) Bc (1) Cf (1)	Bb (3) Cc (3) Bd (2) De (1)	Ad (1) Df (1) Bc (1) De (5) Dd (1) Ce (1) Bb (1)	Aa (1) Ad (1)
ACON-1	aa (2) bb (1) cc (1) dd (1)	aa (1)	aa (5)	aa (2)	aa (12)	aa (4)	aa (1)	aa (2)	aa (1)					Aa (1) Bb (1)	Aa (1)	Aa (7)	Aa (1) Bb (1)
ACON-2	aa (11) bb (2) cc (4)	aa (1)	aa (8)	aa (1) ab (1)	aa (10) ab (2)	aa (1) ad (1)	aa (1) bb (1)	aa (1) bb (1)	ab (1)			aa (1)		Aa (1) Ab (2)	Aa (1) Ab (2)	Ab (2) Bb (3) Cc (1)	Aa (2)
IDH-1	aa (6) bb (2) ac (3) bd (3) dd (4)	aa (3)	aa (2) bc (2) cd (1) bd (3) dd (1)	aa (13)	aa (12) cc (1)	aa (3) bb (1)	aa (11)	aa (1) bb (1)	aa (1)	Aa	bb (1) cc (10)	aa (4)	aa (3)	Bb (2) Cc (6)	Aa (1) Bb (3) Ab (2)	Aa (4) Bb (2) Cc (1)	Aa (1) Dd (1) Bd (1)
IDH-2	aa (6) bb (2)	aa (3)	aa (3) bb (8)	aa (7) bb (2)	aa (11) bb (2)	aa (3) bb (1)	aa (8) ab (3)	cc (2)	Aa (1)		Bb (3) Cc (7)	bb (5)	bb (3)	Aa (1) Bb (7)	Aa (2) Bb (6)	Aa (1) Bb (10)	Cc (2) Ac (1)

				ab (4)													
AAT	ac (2) cc (13)	cc (3)	cc (11)	cc (13)	cc (13)	ac (1) cc (4)	aa (9) cc (2)	Cc (2)	Cc (1)	Cc (1)	Ae (12)	ac (5)	bc (3)	Ac (8)	Cc (5) Ac (6)	Ac (10) Cc (3)	Ac (2) Cc (1)
6PGDH-1	aa (6) bb (6) cc (3)		aa (4) bb (3) cc (1)	aa (9) cc (1)	aa (1)	Aa (3) Bb (1)	aa (4)	Aa (1)		Aa (1)	Bb (1)	aa (4)	aa (1) bb (1)	Bb (3) Cc (1)	Aa (1)	Aa (3)	Cc (2)
6PGDH-2	bb (1) dd (7) bd (2) cc (1) ad (7)	cc (3)	bd (3) dd (5)	ac (1) ad (6) dd (1) ac (1)	Cc (3)	Bd (2) Cc (1) Dd (1)	cc (1) dd (4) ad (4) bb (1)	Ad (1) Cc (1)		Dd (1)	Aa (1) Bb (4) Cc (1) Ad (1) Bc (3)	ad (4) aa (1)	dd (1) ad (1) bd (1)	Aa (1) Ab (5) Bb (2) Ad (1)	Cc (4) Dd (1) Ad (1)	Aa (4) Bb (1) Cc (1) Ab (1) Dd (1)	Bd (2) Dd (1)
66PDH-1	aa (11) bb (6)		aa (7) bb (3)	aa (11)	Aa (3)	Aa (1) Bb (1)	aa (6) bb (4)	aa (2)			Bb (2)	aa (3) bb (1)	cc (3)	Aa (2) Bb (5)	Aa (3) Bb (1)	Aa (3) Ad (3)	Bb (1)
66PDH-2	bb (1) cc (2) dd (2) ad (5) bd (2) cd (2)		ac (3) bd (2) cd (1) dd (4)	ab (1) ac (1) cc (1) dd (1) bd (5) ad (3)	Ad (2) Dd (1)	Bd (2)	ac (4) bc (2) cc (3) bd (1)	ad (1) bd (1)			Ad (4) Bd (1) Cd (3)	bc (4)	bc (2) cc (1)	Ad (2) Bc (4) Cc (1)	Ac (1) Bb (2)	Aa (1) Ac (1)	Ac (1) Ab (1) Cc (1)
LDH	ad (2) cd (6) dd (9)	cd (2) dd (1)	Cd (4) dd (3)	cd (6) dd (7)	cd (9) dd (3)	cd (4)	cd (8) dd (3)	ad (1)	Dd (1)	Dd (1)	cd (7) dd (2)	ae (1) ee (4)	ad (1) cd (2)	Ad (1) Cd (1) Dd (5)	Cc (5) Dd (2) Cd (1)	Cc (3) Dd (3) Ad (1) Cd (2)	Dd (2) Cd (1)
ME 1	Aa (3) Bb (12) Cc (1)	Bb (2)	Aa (4) Bb (2) Cc (3)					Aa (1) Ab (1)					Ab (1)	Aa (3)	Bb (2)	Aa (5)	Aa (3)
ME 2	Aa (2) Bb (9) Cc (4) Ac (1)	Aa (2)	Aa (1) Bb (5) Cc (4)					Bb (1) Bc (1)	Bc (1)				Bb (1)	Bb (1) Cc (1)	Aa (1) Bb (6)	Aa (2) Bb (2)	Bb (1) Cc (1) Bc (1)
ME 3	Aa (2)	Dd (2)	Bb (7)					Aa (1)							Aa (1)	Aa (1)	Bb (1)

	Bb (7) Cc (3)	Be (1)	Cc (2)					De (1)							Bd (2)	Bb (3)	
<b>FUM</b>	aa (1) bb (3) cc (3) dd (2) bd (2) be (2) ce (1)	Bb (2) Bd (1)	bb (2) cc (1) dd (1)	bb (1) cc (1) ae (2) bd (1) ab (1)	bb (1) cc (1) ae (1) be (2)	ac (1)	ac (1) ae (7) be (1) ad (1) cc (1) cd (1)	ae (1)	Bb (1)		bb (2) ae (3) be (3) ad (1)		cd (1) be (1) ce (1)	Ad (2) Cc (1) Dd (1) Be (1) Bd (1)	Ac (1) Bb (1) Bd (1) Dd (1)	Bb (4) Be (1)	Bb (1) Be (1)
<b>PGI-1</b>	bb (1) cc (3)	cc (3)	cc (5)	bb (1) cc (4)	cc (3)	cc (2)	aa (1) bb (6) cc (2)	bb (1)		Cc (1)	cc (9)		cc (3)	Bb (4) Cc (2)	Bb (2) Cc (1)	Bb (2)	Aa (1)
<b>PGI-2</b>	bb (1) cc (5) bc (1)	bb (1)	bb (2) cc (4)	bb (4) cc (2) bc (1)	bb (2) ac (1) bc (1)	cc (1) bb (1)	ab bc bb cc	cc (1)		Bc (1)	aa (1) bb (3) ac (3)	cc (2)	cc (1) ac (1) bb (1)	Bc (5) Cc (1) Bb (1)	Aa (1) Bb (2) Cc (1)	Bb (1)	Bb (1)

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La sistemática de grupos grandes de especies y de poblaciones que pertenecen a especies cosmopolitas suele ser complicada. La razón de esta complicación es que el número de poblaciones a estar es muy grande y los caracteres morfológicos tienden a ser insuficientes. En el caso de *S. occidentales*, los caracteres de morfología externa han sido una herramienta muy útil para distinguir las poblaciones y definir tres morfotipos diferentes dentro de la especie. Sin embargo, la existencia de otras poblaciones que no pertenecen a los tres morfotipos mencionados en los resultados, obligaron a examinar un mayor número de caracteres para dilucidar su identidad. El arreglo taxonómico que más adecuado para *Bufo occidentales* debe considerar que esta especie tiene una distribución muy amplia en México, (la cual incluye el oeste y centro de Zacatecas, oeste de Aguascalientes, hacia el sur por Jalisco hasta Michoacán, Guerrero, Oaxaca y el centro de México, en el sur de Puebla, Tlaxcala, Morelos, Estado de México, Hidalgo, Querétaro y Guanajuato) con tres diferentes morfotipos que provienen del oeste de Chihuahua, las tierras altas del centro de Guerrero y el norte de Puebla, respectivamente. Este arreglo, sin embargo, no ha sido corroborado con el análisis de enzimas en las muestras obtenidas, parte de la razón de esta no corroboración puede ser el hecho de que no se obtuvieron muestras completas de los morfotipos. En concreto, no se obtuvieron muestras del norte de Puebla ya que las localidades en donde se había registrado esta especie provienen de un importante río, actualmente esta zona pertenece a un club de campismo que ha cerrado el río y lo acondicionó para la cría de trucha y otros organismos más. Los registros de Chihuahua provienen de la Sierra Tarahumara, región que ha sido fuertemente castigada por la sequía y en donde sólo se recolectaron cuatro ejemplares, dos de ellos crías. Del tercer morfotipo, que proviene de Guerrero si se obtuvieron once ejemplares, los cuales no muestran una variación importante con respecto al resto de la muestra, aunque si se observa la presencia de un electromorf o (PGI-1a<sup>o</sup>) exclusivo de esta población y que se encontró también en tres especies más del género (*B. marmoreus*, *B. punctatus* y *B. valliceps*).

No se esperaba una correspondencia uno a uno entre los resultados de morfología externa y el análisis de enzimas. De hecho, la morfología externa en este género aparentemente está muy conservada (Maxson, 1984; Maxson et al., 1981) y con frecuencia se observan confusiones entre algunas especies. Tal vez por esta razón no existe en la actualidad una clave completa para la identificación de las especies de Bufo de Norteamérica. En contraste con la morfología, *Bufo occidentales* parece ser muy variable genéticamente, y si se basaran los resultados de este estudio exclusivamente en los resultados genéticos, el arreglo taxonómico sería diferente, separando por un lado a la población que habita en el Altiplano mexicano (Aguascalientes y Zacatecas) y por el otro a las de Guerrero y Michoacán. La población de Michoacán debe estudiarse más a fondo puesto que el tamaño de muestra es muy reducido (dos ejemplares), mientras que la de Guerrero es congruente con la separación morfológica que se realizó al inicio. La presencia de los *genotipos exclusivos* en algunas poblaciones pueden interpretarse como autapomorfios del grupo y en tal caso son caracteres diagnósticos que nos permiten separarlas como especies diferentes porque pertenecen a linajes independientes (Gergus, 1998). *El porcentaje de polimorfismo encontrado en las poblaciones de BR occidentales fue de 30.4 %*, este porcentaje está dentro del rango conocido en anfibios anuros, que es de 33.2 % (Ayala y Kieger, 1984).

*Con los datos* obtenidos hasta ahora, se refuerza la idea que ya se venía manejando, que propone que dentro de lo que se conoce como *Bufo occidentalis* existen en realidad un grupo de 3 especies, dos que ya se están describiendo y *B. occidentalis* que se está red escribiendo. Los tres trabajos están ahora en revisión. Desafortunadamente, el número de caracteres morfológicos es muy pequeño, y los datos enzimáticos están incompletos, esto impide de momento estudiar la filogenia del grupo, la cual debe incluir a *B. americanus*, especie que habita en Estados Unidos de América y de la cual existe la promesa de conseguir muestras de tejidos para completar este trabajo (J. Campbell, com. pers.).

## LITERATURA CITADA

- Ayala, F. J. & J. A. Kiger Jr. 1984. Modern Genetics. Benjamin/Cummings Series, California. 923 + A-I pp.
- Blair, F. W. 1963 Evolutionary relationships of North American toads of the genus *Bufo*: a progress report. *Evolution*, 17: 1-16
- Flores Villela, O. 1993. Herpetofauna mexicana. Spec. Pub. Carnegie Mus. No. 17. 73 pp.
- Ford, L. R. & D. C. Canatella. 1993. The Major clades of frogs. Herpetol. Monographs, 7. 94-117.
- Frost, D. R. & D. M. Hillis. Species in concept and practice: herpetological applications. *Herpetologica*, 46: 87-104.
- Gergus, E. W. A. 1998. Systematics of the *Bufo microscaphus* Complex Allozyme evidence. *Herpetologica*, 54 (3):317-325.
- Graybeal, A. 1993. The phylogenetic utility of cytochrome b: lessons from Bufonid frogs. *Mol. Phyl. Evol.*, 2: 256-269
- Hebert P. D. N. & M. J. Beaton. 1993. Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Helena Laboratories. Beaumont, Texas. 31 pp.

Maxson, L. R. 1984. Molecular probes of phylogeny and biogeography in toads of the widespread genus *Bufo*. *Mol. Biol. Evol.* 1 : 345-356.

Maxson, L. R., A. Song & R. Lopata. 1981. Phylogenetic relationships among North American toads, genus *Bufo*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 9: 347-350.

Mendelson J. R. 1997a. The systematics of *Bufo valliceps* group (Anura: *Bufo*) of Middle America, *Doctor of Philosophy Thesis. The University of Kansas, Lawrence.* 265 pp.

1997b. A new species of *Bufo* (Anura : Bufonidae) from the Pacific highlands of Guatemala and southern Mexico, with comments on the status of *Bufo valliceps macrocristatus* *Herpetologica* 53 : 14-30.

1997c. A new species of toad (Anura : Bufonidae) from Oaxaca, Mexico, with comments on the status of *Bufo cavifrons* and *Bufo cristatus* *Herpetologica* 53 : 59-70.

Morrison, M. E. 1994. A reassessment of the *Bufo spinulosus* group (Anura; Bufonidae) from Peru and Ecuador. Master Art Thesis. The University of Kansas, Lawrence, 114 pp.

Odendaal, F. J. & C. M. Bull. 1983. Genetic divergence between two morphologically similar *Ranidella species* (Anura; Leptodactylidae). *Copeia* 1983: 275-279.

Sall, J. & A. Lehman. 1996. JMP Start Statistics. SAS Institute, Duxbury Press, Belmont. 521 pp.

Richardson, B. J., P. R. Baverstock & M. Adams. 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press, Australia. 410 pp.

Santos Barrera, G. 1995. Taxonomía de *Bufo occidentales* Camerano, 1879 (Anura: Bufonidae) en México. Tesis Maestría en Ciencias, (Biol. Animal). Fac Cienicas, Univ. Nal. Aután. Méx. 62 pp.

Smithe, F. B. 1975. Naturalist's color field guide. Supplement 2. Amer. Mus. Nat. Hist. , New York. III. Parts. 219 pp.

Zug, G. 1993. Herpetology. Academic Press, San Diego. 521 pp.

## APÉNDICE 1.

Diccionario Colecciones Herpetológicas consultadas y colectores:

### COLECCIONES:

AMNH, American Museum of Natural History ANSP,  
Academy of Natural Sciences of Philadelphia BCB, Bryce C.  
Brown Collection  
BYU, Brigham Young University  
CAS, California Academy of Sciences  
CB, Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional CM,  
Carnegie Museum  
FMNH, Field Museum of Natural History  
IBH, Instituto de Biología, Univ. Nal. Autón. Méx. INHS,  
Illinois Natural History Survey  
KU, Kansas University  
LACM, Los Angeles County Museum  
LNLJ, Laboratorio Natural Las Joyas, Univ. Guadalajara LSUMNS,  
Louisiana State University Museum of Natural Sciences MCZ, Museum of  
Comparative Zoology MVZ, Museum of Vertebrate Zoology MZFC, Museo  
de Zoología, Fac. Ciencias, Univ. Nal. Auton. Méx. TCWC, Texas  
Cooperative Wildlife Collection UAA, Universidad Autónoma de  
Aguascalientes UAP, Universidad Autónoma de Puebla UCM, University of  
Colorado Museum  
UIMNH, University of Illinois Museum of Natural History  
UMMZ, University of Michigan Museum of Zoology  
USNM, United States National Museum  
UTACV, University of Texas at Arlington Collection of Vertebrates UTEP,  
University of Texas at El Paso

### COLECTORES:

APN, Alicia Pérez Núñez, Universidad de Guadalajara  
GSB, Georgina Santos Barrera, Univ. Nal. Autón. Méx.  
HRG, Hugo Armando Rivas González, Universidad de Guadalajara

## APENDICE 2

Diccionario de autoridades. Especies de *Bufo occidentalis* que habitan en la República Mexicana. (Basada en Flores Villela, 1993 y con las adiciones de Mendelson III 1997b y c);

*Bufo alvarius* Girard, 1859

- *bocourti* Brocchi, 1877

*B. boreas* Baird & Girard, 1852 *B.*

*canaliferus* Cope, 1877 *B. cavifrons*

Firschein 1950 *B. coccifer* Cope  
1866

- *cognatus* Say 1823
- *compactilis* Wiegmann, 1833 *B.*  
*cristatus* Wiegmann, 1833 *B.*  
*debilis* Girard, 1854 *B. gemmifer*  
Taylor, 1940

- *kellogi* Taylor, 1938
- *luetkeni* Boulenger, 1891
- *macrocristatus* (Firschein & Smith, 1957)
- *marinus* Linnaeus, 1758

*B. marmoreus* Wiegmann, 1833 *B.*

*mazatlanensis* Taylor, 1940 *B.*

*microscaphus* Cope, 1867

*B. occidentalis* Camerano, 1879

- *perplexus* Taylor, 1943
- *punctatus* Baird & Girard, 1852
- *reti formis* Sanders & Smith, 1951
- *speciosus* Girard, 1854
- *spiculatus* Mendelson III, 1997 *B.*

*tacananesis* Smith, 1952

*B. tutelarius*, Mendelson III, 1997 *B.*

*valliceps* Wiegmann, 1833 *B. woodhousei*  
Girard, 1854