

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS

**Determinación sexual de *Basiliscus vittatus*
(Squamata: Corytophanidae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. GABRIEL SUÁREZ VARÓN

Comité Tutorial

Dr. Oswaldo Hernández Gallegos (Tutor Académico)

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz (Tutora Adjunta)

Dr. Diego Claudio Cortez Quezada (Tutor Adjunto)



Toluca, México

2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS

**Determinación sexual de *Basiliscus vittatus*
(Squamata: Corytophanidae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. GABRIEL SUÁREZ VARÓN

Comité Tutorial

Dr. Oswaldo Hernández Gallegos (Tutor Académico)

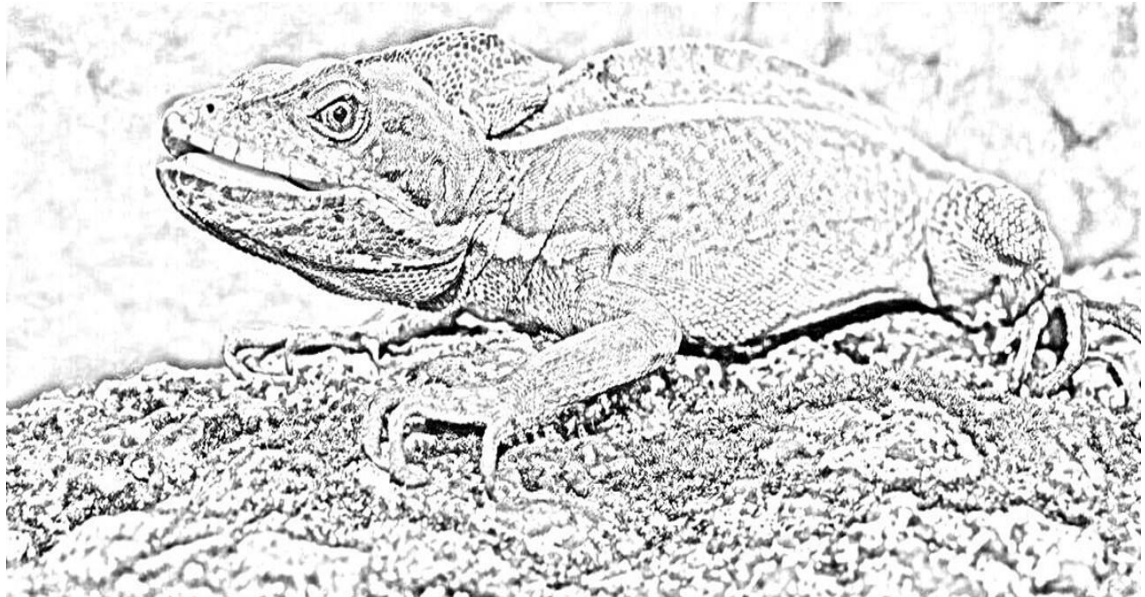
Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz (Tutora Adjunta)

Dr. Diego Claudio Cortez Quezada (Tutor Adjunto)



Toluca, México

2022



ÍNDICE

Prefacio	1
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	7
Hipótesis	13
Objetivos	14
Literatura citada	16
Prefacio de Resultados	19
Capítulo 1	20
Masa relativa de la nidada de <i>Basiliscus vittatus</i> Wiegmann, 1828 (Squamata, Corytophanidae): restricciones morfológicas de la hembra	20
Capítulo 2	30
Variación del estadio embrionario de <i>Basiliscus vittatus</i> (Squamata: Corytophanidae) en la oviposición	30
Capítulo 3	60
Determinación y diferenciación sexual de <i>Basiliscus vittatus</i> (Squamata: Corytophanidae) .	60
3.1 Establecimiento del mecanismo de determinación sexual de <i>Basiliscus vittatus</i> : Coritofánidos reemplazan el sistema cromosómico XY de los Pleurodontos con un nuevo par de cromosomas XY.	61
3.2 Efecto de la temperatura de incubación en el mecanismo de determinación y diferenciación sexual de <i>Basiliscus vittatus</i>	74
Conclusiones generales y perspectivas	113
Literatura citada	116

Prefacio

El presente trabajo consistió en examinar la determinación sexual de *Basiliscus vittatus* en el contexto de la teoría de historias de vida y la evolución de los cromosomas sexuales, analizando variables biológicas utilizadas en el estudio de los mecanismos de determinación sexual en reptiles. Para ello, se presentan tres capítulos donde se discute cómo a partir de analizar características de historia de vida, por ejemplo, rasgos de la nidada y morfología del huevo, se encuentran asociaciones muy importantes que, al estudiarlas, ofrecen información que permite comprender de mejor manera el significado ecológico-evolutivo de las estrategias de historias de vida que emplean los reptiles ovíparos. Esto facilita conocer aspectos de la biología reproductora como base para el desarrollo de experimentos que estudian la determinación sexual, los cuales aportan evidencia de cómo surge la diversificación de las respuestas reproductoras y cómo son utilizadas por las especies. Con esta información, se pueden estimar variables biológicas utilizadas en el estudio de los mecanismos de determinación sexual, un aspecto que parece estar muy estudiado en reptiles, pero con muchos huecos y entendido parcialmente. En este sentido, el primer capítulo de esta tesis tuvo como objetivo describir características morfológicas de las hembras y de la nidada en *B. vittatus* con la finalidad de conocer la relación de la morfología de las hembras respecto a su respuesta reproductora. Esto permitió generar nuevas hipótesis y estimar otras variables que explicaron en conjunto el mecanismo de determinación sexual en esta lagartija. En el capítulo 2, desde que la información disponible acerca de la historia natural, reproducción, etc, para *B. vittatus* es muy limitada, fue necesario utilizar parte de la información generada en el capítulo anterior como lo fueron aspectos morfo-

fisiológicos de las hembras y del huevo; sin embargo, antes de implementar un experimento térmico y someter a los huevos a diferentes tratamientos de incubación y poder responder si *B. vittatus* poseía o no, una determinación sexual dependiente de la temperatura (DST), conocer ahora si las características de historia de vida estudiadas moldean variaciones en el estadio embrionario al momento de la oviposición se convirtió en un aspecto primordial. Dicho estadio de desarrollo embrionario es de gran utilidad para mantener un control experimental y entonces, entender el papel de la temperatura en el desarrollo embrionario y por tanto en la determinación sexual. Finalmente, en el capítulo 3 nuevas hipótesis fueron planteadas con los hallazgos realizados y con el uso de técnicas genómicas y transcriptómicas, se identificó y caracterizó la presencia de micro-cromosomas sexuales y la evidencia de un sistema cromosómico XY de *novo* e independiente al resto de Pleurodontos. Adicionalmente, estudios previos mostraron la existencia de posibles efectos de la temperatura de incubación sobre el fenotipo (100% hembras a 28°C) de crías en *B. vittatus*, este resultado junto al nuevo sistema de cromosomas sexuales, sugirió la existencia de organismos con reversión sexual como consecuencia de la temperatura de incubación a la cual fueron expuestos. Entonces, si la temperatura de incubación tiene efectos en la determinación y diferenciación sexual, el genotipo y el fenotipo de los organismos tendrían que ser discordantes (reversión sexual). Para responder esta incógnita, se analizó y comparó el fenotipo (histología gonadal) con el genotipo recientemente caracterizado (presencia del gen *CAMSAP1* ligado al Y) de *B. vittatus*.

Resumen

La determinación sexual es un proceso que influye en muchos aspectos biológicos en la historia de vida de los organismos, como el establecimiento del sexo; así como de gran importancia en el desarrollo de los individuos y la proporción sexual dentro las poblaciones. El tamaño de la nidada, masa relativa de la nidada, estadio embrionario en la oviposición, diferenciación sexual, son características importantes que se relacionan con factores bióticos y abióticos que interactúan con los reptiles. En el presente estudio, se dan a conocer rasgos de la historia de vida de *Basiliscus vittatus* sobre las limitantes de la respuesta reproductora debida a la morfología de las hembras. Además, por primera vez, se detalla la descripción del estadio embrionario a la oviposición de un integrante de la familia Corytophanidae y el mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus*. El estadio embrionario se asoció con el largo máximo del huevo, el cual parece estar relacionado con factores fisiológicos y morfológicos de las hembras, así como por su estrategia de forrajeo. El mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus* es genético con presencia de un sistema de *novo* de microcromosomas sexuales de tipo XY, diferente al que comparten los demás miembros que integran el clado Pleurodonta. Las condiciones térmicas de incubación influyen en el número de días que son necesarios para que un embrión pase de un estadio de desarrollo embrionario a otro: una mayor temperatura resulta en menores tiempos de incubación. Sin embargo, se observó que la temperatura de incubación no tiene un efecto en la diferenciación gonadal del embrión, siendo en el estadio 35 cuando se acentúan diferencias entre ambos sexos a nivel histológico. Además, la temperatura no tiene un efecto en

la determinación sexual de los basiliscos, dado que el genotipo (XX vs. XY), determinado a través de la presencia del gen *CAMSAP1* ligado al cromosoma Y, coincidió con el fenotipo (ovarios vs. testículos) proveniente de la histología de las gónadas. La presencia de órganos copuladores ocurre desde el estadio 34 en ambos sexos y es posible que embriones de *B. vittatus* presenten una forma de pseudohermafroditismo temporal en la cual ovarios y hemipenes están presentes al mismo tiempo durante múltiples estadios de desarrollo. Será necesario realizar más estudios donde se integre la biología térmica y la biología molecular para entender cómo las temperaturas de incubación pueden influir en el mecanismo de determinación sexual y en las características de la historia de vida de los reptiles.

Abstract

Sex determination is a biological process that influences many aspects of the life history of organisms, as well as of profound importance in the development of individuals and the sex ratio within populations. The clutch size, relative clutch mass, embryonic stage to oviposition, sexual differentiation, are important characteristics that are related to biotic and abiotic factors that interact with reptiles. In the present study, life history traits for *B. vittatus* that integrate the limitations of the reproductive response due to the morphology of the females are disclosed. In addition, for first time are detailed the description of the embryonic stage to oviposition of a member of the Corytophanidae family and the sex determination mechanism of *B. vittatus*. The embryonic stage was associated with the maximum length of the egg, which seems to be related to physiological and morphological factors of the females, as well as their foraging strategy. The sex determination mechanism of *B. vittatus* is genetic with the presence of sex micro chromosomes under an XY chromosomal system, different from that shared by the other members of the Pleurodonta clade. The thermal conditions of experimentation influence the days that elapse for an embryo to change from one stage of embryonic development to another: higher temperature results in shorter incubation times. The incubation temperature had no effect on the gonadal differentiation of the embryo, being stage 35 when differences between both sexes are accentuated at the histological level.

Furthermore, temperature does not have an effect on the sex determination of basilisks, since the genotype (XX vs. XY), determined through the presence of the CAMSAP1 gene linked to the Y chromosome, coincided with the phenotype

(ovaries vs. testes) from the histology of the gonads. The presence of copulatory organs occurs from stage 34 in both sexes and it is possible that *B. vittatus* embryos present a form of temporal pseudohermaphroditism in which ovaries and hemipenis are present at the same time through multiple stages of development. More studies that integrate the thermal and molecular biology are needed to understand how they can shape the sex determination mechanism and life history characteristics in reptiles.

Introducción

La determinación sexual es un proceso que influye en muchos aspectos biológicos en la historia de vida de las especies, así como de profunda importancia en el desarrollo de los individuos (Sarre et al., 2004). Este proceso involucra diferentes aspectos bioquímicos, celulares y hormonales que interactúan en una compleja cascada de señalizaciones que regula la diferenciación de ovarios o testículos (Shoemaker y Crews, 2009).

Los Sauropsida no aves, han existido por más de 300 millones de años (Pokorna et al., 2011). Actualmente este grupo está representado por cuatro Órdenes (Testudines, Crocodylia, Rhynchocephalia y Squamata). Los miembros de este último Orden (*c. a.* 10,000 *spp.*) son un excelente modelo para estudiar la evolución de los mecanismos por los cuales se determina el sexo, ya que por un lado presentan determinación sexual genética (DSG); es decir, tienen cromosomas sexuales de ambos sistemas: ZZ/ZW (hembras heterogaméticas) y XX/XY (machos heterogaméticos). Por otro lado, especies de Squamata también presentan una determinación sexual influenciada por el ambiente conocida como determinación sexual ambiental (DSA) (Janzen y Paukstis, 1991), más comúnmente documentada como determinación sexual dependiente de temperatura (DST), un fenómeno registrado por primera vez en vertebrados en la lagartija *Agama agama* (Charnier, 1966). Cambios entre ambas estrategias han dado como resultado una compleja historia evolutiva en la determinación del sexo en Squamata (Nielsen et al., 2018).

Muchos reptiles con DSG y presencia de cromosomas sexuales crípticos pueden tener micro-cromosomas sexuales como es el caso de *Pogona vitticeps* (Quinn

et al., 2007) o *Eulamprus heatwolei* (Cornejo-Páramo et al., 2020). Dichos microcromosomas fueron descartados durante mucho tiempo al ser considerados no funcionales y a menudo omitidos de los cariotipos. Estudios recientes, sin embargo, apuntan a que merecen un examen más detallado con técnicas nuevas y más sensibles (Ezaz et al., 2005).

Por otra parte, los cromosomas sexuales de los Saurópsidos no aves, muestran estructuras complejas que sugieren múltiples transiciones en el modo de determinación sexual (Ezaz et al., 2009), incluyendo numerosas transiciones de manera independiente entre ellos y, en ocasiones, especies con ambas estrategias de manera simultánea (Nielsen et al., 2018). Una hipótesis ampliamente apoyada menciona que la DSG y DST son mecanismos mutuamente excluyentes e incompatibles; en otras palabras, la determinación sexual nunca está bajo la influencia de los cromosomas sexuales y de la temperatura ambiental al mismo tiempo. Esta hipótesis señala que no hay predisposición genética para que un embrión con DST se desarrolle como macho o hembra debido a la ausencia de cromosomas sexuales, y sólo lo hace hasta que entra en el período termosensible (PTS) de su desarrollo, por lo que el embrión (estadio temprano) antes de este período no tiene un sexo definido (Merchant-Larios et al., 1997).

El interés de cómo divergieron los cromosomas sexuales se ha intensificado con el reconocimiento de que estos cromosomas juegan un papel central en procesos evolutivos como la especiación, la adaptación sexo-específica y el conflicto genético (Gamble et al., 2013). A pesar de un progreso significativo en los últimos años, datos moleculares sobre la estabilidad evolutiva de los cromosomas sexuales entre los escamados existen solo para iguanas (Rovatsos

et al., 2016). Dado lo anterior, surge la hipótesis de la conservación de los cromosomas sexuales. La cual postula que existen tasas variables de degeneración de los cromosomas Y/W, es decir, solo la transición del estado homomórfico al heteromórfico, pero no viceversa. También se ha postulado la hipótesis del “turnover” que dicta que los cromosomas sexuales de origen reciente son homomórficos porque son demasiado “jóvenes” para que la degeneración los haya convertido citogenética y morfológicamente en heteromórficos (Gamble et al., 2013). Aunque con el tiempo, estos nuevos cromosomas también seguirán con la preservación de los loci que determinan el sexo, la degeneración de otro tipo de material genético y, con ello, la posible transición a otro sistema de determinación cuando los cromosomas Y/W hayan llegado a un nivel de degeneración muy acentuado.

La degeneración del cromosoma sexual heterogamético (Y o W dependiendo el sistema) es inevitable e irreversible (Bachtrog et al., 2014) como consecuencia de la evolución de un locus determinante del sexo y la reducida recombinación en las proximidades de este locus (Smith et al., 1999). Este modelo explica la presencia de los cromosomas sexuales heteromórficos en la mayoría mamíferos, aves y serpientes (Smith et al., 1999). Por otro lado, estos cromosomas normalmente muestran pérdida de genes y obtención de secuencias repetidas de ADN ocasionadas por la acumulación de retrotransposones en los cromosomas Y y W (Steinemann y Steinemann, 2005). Como consecuencia, se espera que esta degeneración resulte en diferencias morfológicas entre los cromosomas X/Y o Z/W (Graves, 2008).

Los sistemas de determinación del sexo, particularmente DSG y los cromosomas sexuales, podrían ser evolutivamente estables en muchos linajes de Sauropsida

no aves, pero hace falta evidencia molecular para determinar si esta hipótesis es correcta. Hasta ahora, se ha confirmado una gran estabilidad evolutiva de los cromosomas sexuales en aves, mamíferos, serpientes, Squamata y Anguimorpha (Rovatsos et al., 2016).

Finalmente, cuando surge un nuevo sistema de determinación sexual, DSG o DST, éstos pueden co-existir en la misma población con el viejo sistema de determinación sexual (DST, considerado basal para Sauropsida no aves) hasta cierto periodo de tiempo en el que puede generar un conflicto evolutivo, el cual puede ser mediado por la selección natural, eliminando alguno de los dos sistemas. Por lo tanto, un esfuerzo concentrado para identificar los mecanismos de determinación sexual en este grupo debería emprenderse para llenar los vacíos en nuestro conocimiento.

Diferenciación gonadal

La diferenciación gonadal es un proceso biológico que tiene como finalidad dirigir la formación y la estructura citológica y fisiológica de ovarios y testículos, órganos que promueven la regulación hormonal y conllevan a la diferenciación fenotípica de los individuos (Crews, 1994).

La diferenciación sexual de los vertebrados presenta tres fases de desarrollo. En un inicio, durante el proceso de migración y proliferación, la gónada embrionaria está compuesta por células germinales primordiales (CGPs, células que darán origen a gametos masculinos o femeninos) y por células somáticas de Sertoli en machos y células foliculares o de la granulosa en hembras. Una fase de establecimiento, cuando las células germinales y somáticas se encuentran indiferenciadas y por tanto se consideran bipotenciales. Y la fase de diferenciación, cuando estas células comienzan a experimentar cambios en la conformación y proliferación hacia la zona medular y cortical, involucran un crecimiento y la subsecuente diferenciación hacia un ovario o un testículo completo (Wilhelm et al., 2007).

En los Sauropsida no aves, como ocurre en otros vertebrados, durante la gonadogénesis temprana, y cuando aún las gónadas son indiferenciadas, éstas van acompañadas por conductos paramesonéfricos o de Müller y mesonéfricos o de Wolff. Los primeros son considerados los progenitores de los conductos femeninos, mientras que los segundos darán origen a los conductos masculinos. Se sabe, sin embargo, que durante la diferenciación sexual solo un tipo de conducto se mantendrá y el otro será reabsorbido (Wilhelm et al., 2007).

La diferenciación gonadal inicia cuando se conforma el primordio gonadal y las CGPs (de origen extraembrionario), llegan a las crestas genitales donde proliferan para formar parte de los cordones sexuales; en este momento, por su estructura morfológica bipotencial e histológica, resulta indistinguible un testículo de un ovario (Wilhelm et al., 2007). Para el caso de la diferenciación temprana del ovario, las CGPs proliferan en el epitelio cortical, el cual comienza a engrosarse (Rhen y Schroeder, 2010). Para el caso de la diferenciación testicular, las CGPs se mantienen en el epitelio celómico y proliferan, formando cordones sexuales. De las células somáticas ocurre una invasión de dichos cordones a la región medular que se modifican en una estructura más compacta llamada cordón testicular (Wilhelm et al., 2007; Rhen y Schroeder, 2010).

Hipótesis

Capítulo 1

El tamaño de la nidada y características morfológicas de los huevos, así como la masa relativa de la nidada en *B. vittatus* están limitadas por la morfología corporal de las hembras. Estas características podrían ayudar a entender procesos en la determinación sexual de esta lagartija.

Capítulo 2

El estadio embrionario a la oviposición de *B. vittatus* es variable y está moldeado por características morfo-fisiológicas y de historia de vida de las hembras las cuales confieren ventajas selectivas al momento de la oviposición.

Capítulo 3

El uso de técnicas de genómica y transcriptómica revelarán la presencia o ausencia de cromosomas sexuales en *B. vittatus*. Dado que la familia Corytophanidae se integra dentro del clado de los Pleurodontos, se espera que el mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus* sea genético con presencia de cromosomas sexuales XY.

La temperatura de incubación tiene un efecto en la determinación sexual de *B. vittatus*. Dicho efecto se verá reflejado en el tiempo de incubación para cambiar de un estadio embrionario a otro y en la diferenciación sexual.

Objetivos

General

Evaluar y establecer el mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus*.

Específicos

Capítulo 1

1. Analizar las características de los huevos y la masa relativa de la nidada de *B. vittatus* en el contexto de la teoría de historias de vida para estimar variables biológicas utilizadas en el estudio de los mecanismos de determinación sexual.

Capítulo 2

1. Determinar el estadio embrionario a la oviposición de *B. vittatus* y describir por primera vez el estadio de desarrollo durante la oviposición en un miembro de Corytophanidae para entender el papel de la temperatura en el desarrollo embrionario y en la determinación sexual de *B. vittatus*.

Capítulo 3

1. Identificar y caracterizar el sistema cromosómico de *B. vittatus*, así como el origen evolutivo de dicho sistema de cromosomas sexuales en coritofánidos.
2. Determinar si la temperatura tiene un efecto sobre aspectos del desarrollo embrionario en el proceso de diferenciación gonadal (ovarios vs. testículos).

3. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la comparación del genotipo y fenotipo de múltiples machos y hembras para establecer el mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus*.

Literatura citada

- Bachtrog, D., Mank, J., Peichel, C., Kirkpatrick, M., Otto, S., Tia-Lynn A., Hahn, M., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., y Vamosi, J. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol*, 12, e1001899.
- Charnier, M. (1966). Action de la temperature sur le sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, lacertilien) *Comptes Rendus des Séances de la Societé de Biologie de l'Ouest Africain*, 160: 620-622.
- Cornejo-Páramo, P., Dissanayake, D., Lira-Noriega, A., Martínez-Pacheco, M., Acosta, A., Ramírez-Suástegui, C., Méndez-de la Cruz., F., Székely, T., Urrutia, A., Georges, A. y Cortez, D. (2020). Viviparous reptile regarded to have temperature-dependent sex determination has old XY chromosomes. *Genome Biology and Evolution*, 12: 924-930.
- Crews, D. (1994). Temperature, steroids and sex determination. *Journal of endocrinology*, 142: 1-8.
- Ezaz, T., Moritz, B., Waters, B., Graves, M., Georges, A., Sarre, D. (2009). The ZW sex microchromosomes of an Australian dragon lizard share no homology with those of other reptiles or birds. *Chromosome Research*, 17: 965-973.
- Ezaz, T., Quinn, A., Miura, I., Sarre, S., Georges, A., Graves, M. (2005). The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research*, 13: 763-776.

- Gamble, T., Geneva, A., Glor, R., Zarkower, D. (2013). *Anolis* sex chromosomes are derived from a single ancestral pair. *Evolution*, 68: 1027-1041.
- Graves J. M. (2008). Weird Animal Genomes and the Evolution of Vertebrate Sex and Sex Chromosomes. *The Annual Review of Genetics*, 42: 565-86.
- Janzen, F., Paukstis, G. (1991). Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution and experimental design. *The quarterly review of biology*, 66: 149-179.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramírez, S, Moreno-Mendoza, N., y Marmolejo-Valencia, A. (1997). Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 107: 373-385.
- Nielsen, S., Banks, J. L., Diaz, R. E., Trainor, P. A., y Gamble, T. (2018). Dynamic sex chromosomes in Old World chameleons (Squamata: Chamaeleonidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 1-7.
- Pokorná, M., Massimo, G., Kratochvíl, L., Kasai, F., Trifonov, A., O'Brien, P., Caputo, V., Olmo, E., Ferguson-Smith, M., Rens, W. (2011). Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma*, 120: 455-468.
- Quinn, A. A., Georges, A., Sarre, S. D., Guarino, F., Ezaz, T. y Graves, J. A. M. (2007). Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science*, 316: 411.
- Rhen, T., y Schroeder, A. (2010). Molecular Mechanisms of Sex Determination in Reptiles. *Sexual development*, 4: 16-28.

- Rovatsos, M., Vukic, J., Pokorná, M.J., Altmanová, M., y Kratochvíl, L. (2016). Conservation of sex chromosomes in lacertid lizards. *Molecular Ecology*, 1-9.
- Sarre, S. D., Georges, A., y Quinn, A. (2004). The ends of a continuum: genetic and temperature dependent sex determination in reptiles. *BioEssays*, 26: 639-645.
- Shoemaker, C. y Crews, D. (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20: 293-303.
- Smith, C., McClive, P., Western, P., Reed, K., y Sinclair, A. (1999). Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 9: 601-602.
- Steinemann, S., y Steinemann, M. (2005). Y chromosomes: born to be destroyed. *BioEssays*, 27: 1076-1083.
- Wilhem D., Palmer S. y Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87: 1-28.

Prefacio de Resultados

La presente tesis doctoral examinó la determinación sexual de *B. vittatus* basado en la teoría de historias de vida y la evolución de los cromosomas sexuales. Para lo cual, la investigación se dividió tres capítulos; en el capítulo 1 se presentan datos sobre la masa relativa de la nidada, nidada y morfología de las hembras de *B. vittatus*, donde se examinaron las asociaciones morfo-fisiológicas entre estas variables que explican características de historia de vida y las cuales permiten conocer aspectos de la biología reproductora como base en el desarrollo de experimentos para estudiar la determinación sexual. El segundo capítulo se dedicó a conocer el estadio embrionario en la oviposición y cómo las características morfo-fisiológicas de las hembras moldean variaciones en dicho estadio embrionario, el cual es de gran utilidad cuando se planea tener un control a nivel experimental y observar los efectos térmicos de incubación en el desarrollo embrionario y en la determinación sexual. Finalmente, el capítulo 3 versa en el objetivo de identificar y caracterizar el sistema cromosómico de *B. vittatus*, en este sentido con el conjunto de variables biológicas y el uso de técnicas genómicas y transcriptómicas se encontró la presencia de microcromosomas sexuales y la evidencia de un sistema cromosómico XY de *novo* e independiente al resto de Pleurodontos (capítulo 3.1). Adicionalmente, una vez caracterizado el sistema cromosómico de *B. vittatus*, el capítulo 3.2 radicó en contestar si la temperatura de incubación tiene efectos en la determinación y diferenciación sexual a través de analizar y comparar el fenotipo (histología de gónadas) con el genotipo (presencia del gen *CAMSAP1* ligado al Y) de *B. vittatus*.

Capítulo 1

**Masa relativa de la nidada de *Basiliscus vittatus* Wiegmann,
1828 (Squamata, Corytophanidae): restricciones
morfológicas de la hembra**

Relative clutch mass of *Basiliscus vittatus* Wiegmann, 1828 (Squamata, Corytophanidae): female morphological constraints

Gabriel Suárez-Varón¹, Orlando Suárez-Rodríguez¹, Gisela Granados-González², Maricela Villagrán-Santa Cruz³, Kevin M. Gribbins⁴, Diego Cortez-Quezada⁵, Oswaldo Hernández-Gallegos¹

¹ Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México, C. P. 50000, México

² Laboratorio de Morfofisiología de la Reproducción, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100 Centro, Toluca, Estado de México, C. P. 50000, México

³ Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 04510, Distrito Federal, México

⁴ Department of Biology, University of Indianapolis, 1400 E. Hanna Ave., Indianapolis, Indiana 46227, USA

⁵ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 62210, Cuernavaca, México

<http://zoobank.org/5CAE1E58-CA0F-4CE2-88FB-19E61CF90326>

Corresponding author: Gabriel Suárez Varón (biogabrielsv@gmail.com)

Academic editor: Silke Schweiger ♦ Received 3 May 2019 ♦ Accepted 29 August 2019 ♦ Published 17 September 2019

Abstract

Clutch size (CS) and relative clutch mass (RCM) are considered important features in life history descriptions of species within Squamata. Variations in these two characteristics are caused by both biotic and abiotic factors. The present study provides the first account related to CS and RCM of *Basiliscus vittatus* in Mexico within a population that inhabits an open riverbed juxtapositioned to tropical rainforest habitat in Catemaco, Veracruz, Mexico (170 m a.s.l.). Twenty-nine gravid females were collected and kept in captivity under favorable conditions that promote oviposition. The CS within this population was 6.2 ± 0.2 and was correlated positively with snout vent-length (SVL); while the RCM was 0.17 ± 0.006 and was correlated positively with both CS and width of egg. Factors, such as female morphology and environmental conditions, should influence these reproductive traits in *B. vittatus*. The data collected in this study could provide a framework for comparisons of the life history traits across populations of *B. vittatus* in Mexico and within other species of the family Corytophanidae and provide a model for testing how abiotic and biotic factors may influence the CS and RCM in basilisk lizards throughout their range.

Key Words

clutch size, Corytophanidae, female morphology, lizard, reproduction, reproductive effort

Introduction

Reptiles vary in terms of reproductive output, such as the clutch size (CS), egg dimensions, time that reproduction occurs during their lifespan, age, and relative clutch mass (RCM). Normally in many species of reptiles, these life

history traits show complex relationships to both female body size (Radder and Shanbhag 2003) and intra- and inter-population variation (Castilla and Bauwens 2000; Kiefer et al. 2008). Thus, when these parameters are determined, information is provided on reproductive strategies that are utilized by different populations of a single species

(Shine and Greer 1991). These variations of reproductive outputs have been attributed to both (1) abiotic factors that mainly include temperature and rainfall (Fitch 1985; Ji and Brana 2000), and (2) biotic factors such as body size, morphology, and age (Goodman et al. 2008). Thus, the study of life history traits may increase our understanding of how individuals of each species interact with the environment and the environment's role in reproductive output.

The relative clutch mass has been considered one of the most important life history traits in reptiles (Tinkle et al. 1970; Vitt and Price 1982), and studied as the ratio of clutch mass with respect to the female mass (Pianka and Parker 1975; Gerald and Miskell 2007) or as the proportion of energy destined for reproduction (Vitt and Congdon 1978), and is considered an indirect estimate of reproductive effort in squamates (Tinkle 1969; Seigel and Fitch 1984). Several hypotheses have been proposed from the study of life history traits in reptiles that suggest that female body morphology and both clutch size and relative clutch mass have coevolved with foraging mode (Vitt and Congdon 1978). Therefore, sit-and-wait foragers tend to have robust bodies, high clutch size and relative clutch mass values, and low escape velocities; while active foragers show cylindrical bodies, low clutch size and relative clutch mass values, and high escape velocities (Vitt and Congdon 1978; Vitt and Price 1982; Rodríguez-Romero et al. 2005; Mesquita et al. 2016).

Basiliscus vittatus Wiegmann, 1828 is an oviparous lizard of the family Corytophanidae and is widespread in tropical regions of America. In Mexico, the Brown Basilisk has been recorded in Jalisco, Michoacán, Puebla, Tamaulipas, Veracruz, and also throughout Central America down to Panama (Campbell 1998; Castañeda-Hernández et al. 2011). The Brown Basilisk is also now registered in Florida as an introduced and invasive species (Krysko et al. 2006). For its habitat preferences, *B. vittatus* can be semi-aquatic, terrestrial, and a semi-arboreal lizard. According to previous studies, *B. vittatus* neonates show a habitat preference close to water bodies, while juveniles and adults tend to move away from permanent aquatic sources and have perch sites more elevated (Hirth 1963; Fitch 1973).

Particularly within the family Corytophanidae, studies about life history characteristics are scarce. In the genus *Basiliscus*, there are a few studies detailing aspects of natural history, which provide characteristics by habitat preferences, thermoregulation, and spatial movements (Hirth 1963; Fitch 1973; Laerm 1974), and others have related ecological and life history data (Van Devender 1982; Vaughan et al. 2007; Lattanzio and LaDuke 2012; Hernández-Córdoba et al. 2012). Unfortunately, much of the information obtained in these studies does not correspond to recently oviposited eggs and most samples were taken from different populations (Ortleb 1965; Lieberman 1980); in addition the limited samples size could promote variations in life history traits. The Brown Basilisk is classified as a type of passive forager (Cooper et al. 2013), however the wide range of microenvironments

it can occupy (aquatic, terrestrial and arboreal) may possibly promote restrictions in its relative clutch mass. Recently, in a Mexican *B. vittatus* population localized in Ejido López Mateos, Catemaco, Veracruz, characteristics in regard to nesting site choice and dimensions of eggs were recorded for the first time (Suárez-Varón et al. 2016). It is now possible, using this new data, to make comparisons with populations of basilisk lizards distributed more to the south of this nesting description, for example, in Costa Rican populations (see, Hirth 1963; Fitch 1973), and to observe the effects of biotic/abiotic factors on reproductive output among different populations of *B. vittatus* in Mexico and other Central American locations. Thus, the purpose of the present study is to provide clutch traits and relative clutch mass data for a single population of *B. vittatus* that inhabits an open riverbed juxtapositioned to tropical rainforest habitat in Catemaco, Veracruz, Mexico. This study may help: (1) to elucidate if a relationship exists between life history traits (i.e., CS and RCM) and different biotic/abiotic factors (including morphological traits of females), (2) allow a comparison of these female reproductive traits within different populations of Mexican *B. vittatus*, and other lizards especially within the family Corytophanidae.

Materials and methods

Study area

The study was carried out in the community of La Selva del Marinero, Ejido Adolfo López Mateos, Catemaco, Veracruz, Mexico (18°26'36.3"N, 94°37'81.9"W, ca. 170 m a.s.l.). The climate is warm-humid with a mean temperature of 27 °C and 4964 mm of annual precipitation; the rainy season extends from June to February and the dry season occurs from March to May (Ibarra-Manríquez and Sínaca 1987).

Animal collection

We sampled monthly from April to July 2016, and June 2018 corresponding to the months in which gravid females (Fig. 1) were registered in earlier studies (Suárez-Varón 2015). The females were found in areas close to the water, on branches, trunks, riparian vegetation, soil, and rocks in an open riverbed near tropical rainforest habitat. We captured females manually and with the help of a noose. To evaluate their reproductive condition, an abdominal palpation and a visual assessment were performed, where the gravid females showed a contour in the abdomen region (Castilla and Bauwens 2000; Boretto et al. 2014). Once the reproductive condition of the females was determined, the following morphological data were recorded just for gravid females: snout-vent length (SVL), and inter-limb distance (ILD) to the nearest millimeter with a digital caliper; additionally, the body weight was measured and we considered the total weight (equal to the female weight +



Figure 1. Gravid female of *Basiliscus vittatus* from La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz. Photo by Kevin M. Gribbins.

clutch mass, TW). Female lizards were then transported to the laboratory within large cotton bags.

Within the lab, each female was maintained in individual terrariums of 1 m × 50 cm × 50 cm (length, width and height, respectively) made with glass and wood. Soil substrate from the study site was added to tanks and mounds of soil were formed in these terrariums. Moreover, branches and rocks were also included as refuges, as well as resting/basking sites for the captive females.

Laboratory conditions

To maintain a thermal gradient between 20–40 °C, incandescent lamps of 75 watts were placed inside the terrariums to provide light and heat on one end of the tank, a photoperiod of 12/12 hrs (photofase/scotophase) was maintained respectively, the terrariums were sprayed daily with water to maintain the proper humidity. Finally, females were fed every third day with crickets (*Acheta domesticus*) and larvae (*Tenebrio molitor*), and water was provided *ad libitum* until the termination of oviposition.

The terrariums were monitored daily and the presence of eggs in the terrarium or abdominal flaccidities of females were observed. After the oviposition process (no later than 3 hours post-oviposition), the body mass of each female was recorded; this value was considered as the absolute mass of the female (AM). Next, the eggs morphology were measured: clutch size was calculated as the total number of eggs in the nest, clutch mass (CM) was determined from the sum of the masses of all eggs recently oviposited, maximum length and width of the eggs

was measured (ML and MW); to estimate the volume of the eggs (VE) we used the equation of an ellipsoid $V = 4/3 \pi (\frac{1}{2} L) (\frac{1}{2} W)^2$ where L is the maximum length and W is the maximum width (Shanbhag et al. 2000). The relative clutch mass index was also calculated by Tinkle's method (1969), which corresponds to the ratio of the clutch mass to total weight.

Statistical analysis

We evaluated differences between the residuals of regression of clutch size and SVL between years. Additionally, we used a normality test (Kolmogorov-Smirnov, Zar 1999) on all variables analyzed, descriptive statistics were estimated (mean ± standard error, minimum and maximum), and the coefficient of variation (CV = standard deviation / mean × 100) was calculated as a measure of the variability observed for parameters of the clutch data to elucidate the highest percentage of variation of traits. To evaluate whether the female morphology condition (robustness) had an effect on the clutch size and clutch mass, the residuals of the regression between the log SVL and the log absolute mass were used as independent variables in regression analysis with clutch size and clutch mass as dependent variables (Shanbhag et al. 2000). Pearson's correlations were also used to analyze if there are relationships between female morphology traits (SVL, AM, and ILD) and their reproductive traits/effort (CS, CM, MW, ML, VE, and RCM). All statistical analyses were performed in STATGRAPHICS (V 16.1), results were deemed significant if $p < 0.05$.

Results

Clutch size and dimension of the eggs

One hundred and eighty-two eggs were analyzed from 29 gravid females ($n = 18, 2016; n = 11, 2018$) of *B. vittatus*. The dates were analyzed overall given that the residuals between sampling years did not differ significantly ($p = 0.17$). The female with the smallest SVL that was palpated positive for the presence of eggs was 106 mm. The female morphology trait with the lowest variation was SVL ($CV = 6.5\%$), and conversely the absolute mass show the highest variation ($CV = 21.6\%$). In the case of reproductive traits, maximum length and maximum width of the eggs were the characteristics that showed the smallest variation ($CV = 6.5$ and 6.4% , respectively), while relative clutch mass ($CV = 20.7\%$) and clutch size ($CV = 20.3\%$) are the traits with the most variation for reproductive traits. Additional information about descriptive statistics related with morphology of the female and their reproductive traits (mean, standard error, range and CV) are also shown in Table 1.

With the female morphological traits, SVL was associated with inter-limb distance ($r = 0.48, p = 0.008$), and absolute mass ($r = 0.80, p = 0.001$) while the regression analyses within reproductive traits display additional relationships: clutch size with both maximum width ($r = 0.41, p = 0.02$), and volume of eggs ($r = 0.46, p = 0.01$). Also, the comparison between female morphological traits with reproductive traits show that SVL was correlated with clutch size ($r = 0.58, p = 0.001$; Fig. 2), and both maximum width

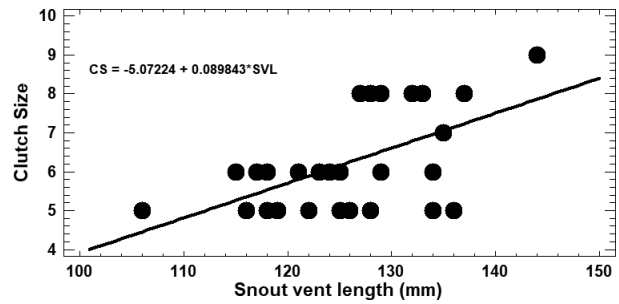


Figure 2. Relationship between snout vent length (SVL) and clutch size (CS) in *Basiliscus vittatus* from La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz.

($r = 0.44, p = 0.01$), and volume of eggs ($r = 0.54, p = 0.002$; Fig. 3), but was not correlated with other traits of the eggs (Table 2). Absolute mass was correlated with clutch size ($r = 0.48, p = 0.009$), maximum width ($r = 0.37, p = 0.04$), and volume of the eggs ($r = 0.40, p = 0.02$). Robustness of females was not significant in terms of both clutch size ($r = 0.01, p = 0.92$) and clutch mass ($r = 0.18, p = 0.32$).

Relative clutch mass

The mean of relative clutch mass was 0.17 ± 0.006 (Table 1) and was positively correlated with clutch size ($r = 0.51, p = 0.004$), clutch mass ($r = 0.52, p = 0.004$), and maximum width of the eggs ($r = 0.39, p = 0.03$). Otherwise, when relative clutch mass was analyzed with other female morphology traits, no correlations were observed (Table 2).

Table 1. Statistical summary for female morphology: SVL (snout-vent length), AM (absolute mass), and ILD (inter-limb distance), and reproductive traits: RCM (relative clutch mass), CS (clutch size), CM (clutch mass), ML (maximum length), MW (maximum wide), and VE (volume of egg) in *Basiliscus vittatus* from La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz.

Trait	Mean	SE	Min	Max	CV %	N
SVL (mm)	126.3	1.500	106.00	144.00	6.5	29
AM (g)	46.4	1.800	26.80	67.00	21.6	29
ILD (mm)	62.7	1.000	53.90	74.70	9.3	29
RCM	0.17	0.006	0.06	0.22	20.7	29
CS	6.2	0.200	5.00	9.00	20.3	29
CM (g)	1.5	0.010	0.80	2.20	16.5	182
VE (mm ³)	1331.9	15.200	827.40	1782.01	15.4	182
ML (mm)	19.7	0.090	16.50	22.70	6.5	182
MW (mm)	11.3	0.050	8.90	12.70	6.4	182

Table 2. Linear regression analysis of the relationship between female traits (SVL = snout vent length, ILD = inter-limb distance, AM = absolute mass), and reproductive traits (CS = clutch size, CM = clutch mass, ML = maximum length, MW = maximum wide, VE = volume of egg, and RCM = relative clutch mass) of *Basiliscus vittatus* from La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz. The * indicates a relationship between both traits.

Trait	R ²	p	Trait	R ²	p	Trait	R ²	p
SVL vs RCM	1.7	0.490	AM vs RCM	10.10	0.090	ILD vs RCM	9.500	0.100
SVL vs ILD	22.8	0.008*	AM vs CS	22.60	0.009*	ILD vs CS	1.600	0.500
SVL vs AM	64.5	0.001*	AM vs CM	5.30	0.220	ILD vs CM	0.350	0.760
SVL vs CS	33.8	0.001*	AM vs ML	0.83	0.630	ILD vs ML	0.002	0.970
SVL vs CM	5.1	0.230	AM vs MW	14.10	0.040*	ILD vs MW	1.800	0.480
SVL vs ML	0.7	0.660	AM vs VE	16.30	0.020*	ILD vs VE	10.400	0.080
SVL vs MW	19.2	0.010*						
SVL vs VE	29.7	0.002*						

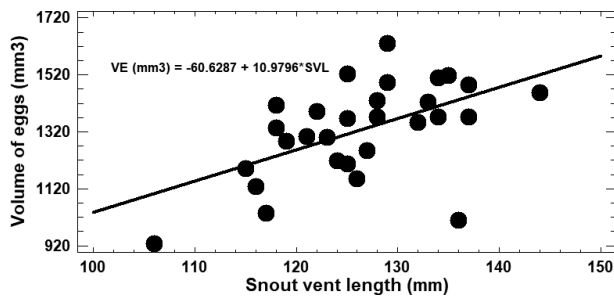


Figure 3. Relationship between snout vent length (SVL) and volume of eggs (VE) in *Basiliscus vittatus* from La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz.

Discussion

The mean clutch size of *B. vittatus* in this study is 6.2 eggs (range 5–9 eggs/female), which is within the known range for this species (range 3.9–12 eggs), for the genus (range 3.9–18 eggs), and for the family Corytophanidae (Table 3). Although in squamates clutch size varies between congeners distributed in regions with different requirements (Hamilton et al. 2008), it is also affected by strategies of reproduction within populations. For example, if there are one or more clutches per season, variation in clutch size should occur in later clutches (Vitt 1977). In the present study, we do not know if there are multiple clutches in our study population; however, according to previous evidence *B. vittatus* shows multiple clutches (Fitch 1973). In this study, we did not consider the effect of multiple clutches on clutch size and relative clutch mass since we are unsure if multiple clutches occur in our population. A future study will investigate whether single or multiple clutches occur within our population at our study site.

Our results show that females of *B. vittatus* with larger body sizes have larger clutch sizes compared to smaller females (Fig. 2). Although there are some lizards that do not show this relationship of body size to clutch size (Wen-San 2010; Ljubicavljević et al. 2012), this pattern is common in many squamates (Radder and Shanbhag

2003), and includes other genera of tropical lizards such as *Tropidurus* (Vitt and Goldberg 1983), *Eurolophosaurus* (Galdino et al. 2003), and *Emoia* (Hamilton et al. 2008). Also, the association between SVL with inter-limb distance is important, since larger abdominal cavities allow the storage of more eggs (Williams 1966; Castilla and Bauwens 2000; Kratochvil and Kubicka 2007). Thus, the body size of the female allows for an increase in clutch size and maximum width of the eggs (Table 2). In addition, the increase in body size of squamates has been closely related to its reproductive response; females with higher SVL tend to maximize their fitness by increasing the numbers of eggs (Rutherford 2004). However, their chances of reproducing in future events may be restricted due to their increased susceptibility to predation because of decreased locomotor capacity and escape velocity (Galdino et al. 2003). Likewise, the increase in body size should be an evolutionary advantage that allows females not only to fill the larger abdominal space, but also increase the capacity to store energy reserves (e.g., food reserves, fat bodies) allocated towards reproduction (Williams 1966; Qualls and Shine 1995). Energy reserves in some reptilian species are reduced considerably during the gestation period by a cessation of food intake, which has been observed to affect growth and physical condition of the female (Shanbhag et al. 2000). In the present study, the effect of robustness (female body condition) on the variations of clutch size and clutch mass was not supported because no significant association between these variables was observed as recorded in previous studies of others lizards (Shanbhag et al. 2000). Thus, much of the available energy stores within reproducing females may be allocated immediately to reproduction (Shine 1980; Wilkinson and Gibbons 2005; Warner et al. 2008).

A central theory in vertebrate life histories is the trade-off between clutch size and dimensions of eggs (Stearns 1992). In regards to this theory, the clutch size of *B. vittatus* was related to maximum width and volume of the eggs regardless of the SVL of the female. Our data suggest that the variations present in the dimensions of the eggs show limitations imposed by the clutch size supporting this

Table 3. Clutch size in family Corytophanidae, the data correspond to mean values.

Species	Clutch size	Reference
<i>Basiliscus vittatus</i>	6.2	This study
	4.2	Hirth 1963
	3.9	Fitch 1973
	12.0	Alvarez del Toro 1982; Guyer and Donnelly 2004
	4.0	Campbell 1998
	5.2	Meiri et al. 2012
	5.4	Scharf et al. 2015
<i>B. basiliscus</i>	18.0	Ortleb 1965
	6.2	Fitch 1973
	8.0	Lieberman 1980
	9.2	Meiri et al. 2012
<i>B. galeritus</i>	5.0	Almendárez and Brito 2012
<i>Corytophanes hernandezii</i>	3.0–4.0	Alvarez del Toro 1982
<i>C. cristatus</i>	6.0	Ream 1965
<i>Laemanctus serratus</i>	3.0–5.0	Martín 1958
<i>L. longipes</i>	4.0–6.0	Alvarez del Toro 1982

trade-off hypothesis. Thus, the volume of eggs is more variable in comparison with consistent and less variable measures of maximum length and width of the eggs. This supports the adaptative canalization hypothesis, which suggests that maternal investment is related to body size, promoting a higher clutch size, but not larger eggs (Brockelman 1975). In contrast, clutch mass and volume of egg were traits that displayed more variation within reproductive traits, which have been strongly correlated to female body size (Fig. 3) or body mass because these traits can limit/enhance the amount of available abdominal space for carrying eggs (Shine 1992). In contrast, egg size is invariant to different selective pressures, such as physiologic mechanisms, predation, climatic tolerance, as well as the agility of the females during gravidity (Shine and Greer 1991). Then, the size of egg is most likely limited by: 1) the length and arrangement of eggs within the oviduct (Ford and Seigel 1989), and 2) by the size of both the pelvic girdle (Congdon and Gibbons 1987) and vent of the females to facilitate the oviposition process.

Furthermore, clutch size is molded by environmental characteristics attributed to abiotic factors such as precipitation, seasonality, or temperature (Ji and Brana 2000; Lepage and Lloyd 2004) because these factors modify the availability of resources (e.g., food) and thus, the energy that females can acquire prior to reproductive events (Ballinger 1977; Seigel and Fitch 1984). Consequently, clutch size is a trait that has evolved as an adaptive mechanism to environment pressures (Fitch 1985), especially in those species that are widely distributed and whose adult body size shows a range of variability (e.g., *B. vittatus*). Thus, changes in clutch size are expected (Fitch 1970) as a result of different selective pressures to local environment constraints (Shine and Downes 1999), which is balanced by maintaining an optimal number of eggs that allows greater fitness in females (Fitch 1970; Shine and Greer 1991). The variation in clutch size among populations probably reflects differences in the availability of energy resources that females obtain and which are influenced by the biotic and abiotic conditions of each local study area.

Within our data, female *B. vittatus* raise their relative clutch mass at the same time that their clutch size increases; the inversion towards reproduction can increase or decrease with respect to the age, weight, and size of the females, in such a way that the energy available for reproduction is allocated in an optimum amount within each egg (Doughty and Shine 1998; Radder and Shanbhag 2004; Orrell et al. 2004).

The fact that there is no observable relationship between relative clutch mass and SVL in *B. vittatus* suggests that larger females do not proportionally exhibit greater reproductive effort (Stuart-Smith et al. 2007). However, in *B. vittatus* clutch size and relative clutch mass are limited by body morphology (SVL and absolute mass respectively) rather than by foraging mode or escape velocity, thus the only way females can increase their reproductive responses are to be larger in order to

produce more eggs. According to the regression model ($CS = -5.07224 + 0.089843 * SVL$, Fig. 2), which estimates the body size that allows the females to increase their clutch size; then, substituting our CS (= 6.2 eggs) into this model equates to an increase in 8% female SVL for each egg added since the difference between our SVL (mean = 126.3 mm) and the estimated SVL = 136.596 mm (for 7.2 eggs in the model equation) implies an increase of 10.2 mm of female SVL. This indicates that the reproductive response in *B. vittatus* is strongly linked to the body morphology, which involves the SVL and absolute mass of the females. Future studies should incorporate abdominal-volume data (Shine 1992) to evaluate if body shape (more than inter-limb distance) restricts or promotes reproductive output. This should offer a model for the index of available space in the abdominal cavity and the egg carrying capacity of the female squamates.

The relative clutch mass of *B. vittatus* (0.17) in the present population is similar to other studied species within the family Corytophanidae, as reported by Scharf et al. (2015): genus *Basiliscus* (= 0.21, *B. plumifrons* Cope, 1875); (= 0.18, *B. galeritus* Duméril, 1851); (= 0.16, *B. basiliscus* Linnaeus, 1758), and genus *Laemanctus* (= 0.17, *L. longipes* Wiegmann, 1834), which contrast to the highest relative clutch mass recorded in *Corytophanes cristatus* Merrem, 1820 (= 0.27), an extreme passive foraging lizard (Andrews 1979). Mesquita et al. (2016) also obtained a lower relative clutch mass value (= 0.08) for *B. vittatus*; and it appears that the variation in relative clutch mass is more easily observed at the population level rather than at the species level (Du et al. 2005). It has also been hypothesized that relative clutch mass has coevolved with foraging mode (Vitt and Congdon 1978); however, in this study there is no supportive evidence for this hypothesis; since the value of relative clutch mass index obtained for *B. vittatus* is close to that of active foragers (RCM = 0.17, Mesquita et al. 2016). Therefore for this study, we suggested that both traits are under independent selective pressures regarding foraging mode for *B. vittatus*. Although *B. vittatus* is classified as a sit and wait forager based on low movements per minute and percentage of activity (Cooper et al. 2013), it has lower values in its reproductive investment when compared with other sit and wait species, such as: *Phrynosoma orbiculare* Linnaeus, 1789 (= 0.27, Suárez-Rodríguez et al. 2018), *Sceloporus clarkii* Baird & Girard, 1852 (= 0.30, Shine 1992), and *Sceloporus grammicus* Wiegmann, 1828 (= 0.28, Rodríguez-Romero et al. 2005). These lizards have been associated with high values in relative clutch mass, low escape velocities, and robust bodies (Vitt and Congdon 1978; Vitt and Price 1982). This contrast in *B. vittatus* versus other sit and wait squamates may be due to the fact that the relative clutch mass of *B. vittatus* is considerably limited by its body morphology, since it has an elongated body and tail such as those observed in active foragers (Teiidae) (Ramírez-Bautista et al. 2000) and longer posterior extremities that facilitate running to high speeds even across the surface of water (Hirth 1963). According to this, it is suggested that *B. vittatus*

may hold an intermediate position between both foraging modes, which may provide information on the evolution of more complex adaptations, such as escape mechanisms (Cooper 2005). In this way, the reproductive effort in *B. vittatus* has been molded to maintain its locomotor skills such as: velocity of escape, attachment to branches, submersion, etc., all making the Brown Basilisk less vulnerable to predation (Geral and Miskell 2007; Suárez-Varón unpublished results). Consequently, natural selection may favor individuals in this population of lizards with an optimal relative clutch mass that allows for escape performance in different microhabitats in which these lizards occupy, but still maintains little variation in the dimensions of the egg, which has been associated with low values in relative clutch mass index (Harvey and Pagel 1991). This implies that an optimization of the clutch size and clutch mass is in play to maximize fitness. Finally, the clutch size and relative clutch mass may show a response to multiple selective pressures caused by: 1) local environmental effects (Vitt 1981; Zamora-Abrego et al. 2007), 2) constraints associated to the body morphology (Vitt and Price 1982), 3) microhabitat (Vitt 1981), and 4) foraging and escape strategies, as well as the use of crypsis (Vitt and Congdon 1978; Rodríguez-Romero et al. 2005), which limit the reproductive output and should influence both clutch size and relative clutch mass.

Acknowledgements

To Ana E. López-Moreno y Ailed Pérez-Pérez for aiding in the collection of lizards. We also thank the community of La Selva del Marinero for field assistance and SEMARNAT for Scientific Collector Permit: SGPA/DGVS/03412/19. Also, to two anonymous reviewers and Silke Schweiger (Subject editor) for their comments and suggestions that improved the manuscript. This project was supported by grants PA-PIIT-UNAM (No. RA-200516 and No. RA-200518) awarded to DC and UAEM 4668/2019SF to OH-G.

References

Almendárez A, Brito J (2012) Ampliación del rango distribucional de *Drymarchon melanurus* (Colubridae) y *Basiliscus galeritus* (Iguanidae-Corytophaninae), hacia los bosques secos interandinos del norte del Ecuador. *Revista Politécnica* 30(3): 179–183. <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/5055/4/Drymarchon%20melanurus%20y%20Basiliscus%20galeritus%202012Politecnica30%283%29.pdf>

Alvarez del Toro M (1982) Los reptiles de Chiapas. Instituto de Historia Natural, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, 248 pp.

Andrews R (1979) The lizard *Corytophanes cristatus*: an extreme “sit-and-wait” predator. *Biotropica* 11(2): 136–139. <https://doi.org/10.2307/2387791>

Ballinger R (1977) Reproductive strategies: food availability as a source of proximal variation in a lizard. *Ecology* 58(3): 628–635. <https://doi.org/10.2307/1939012>

Boretto JM, Cabezas-Cartes F, Kubisch EL, Sinervo B, Ibarguengoytia N (2014) Changes in female reproduction and body condition in an endemic lizard, *Phymaturus spectabilis*, following the Puyehue volcanic ashfall event. *Herpetological Conservation and Biology* 9(1): 181–191. <https://core.ac.uk/download/pdf/158831400.pdf>

Brockelman W (1975) Competition, the fitness of offspring, and optimal clutch size. *The American Naturalist* 109(970): 677–699. <https://doi.org/10.1086/283037>

Campbell JA (1998) Amphibians and reptiles of Northern Guatemala, the Yucatán, and Belize. University of Oklahoma Press, Norman, Oklahoma, USA, 380 pp.

Castañeda-Hernández C, Ramírez-Valverde T, Meza-Parral Y, Sarmiento-Rojas A, Martínez-Campos A (2011) Ampliación de la distribución geográfica de *Basiliscus vittatus* en el estado de Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82(3): 1046–1048.

Castilla A, Bauwens D (2000) Reproductive characteristics of the lacertid lizard *Podarcis atrata*. *Copeia* 2000(3): 748–756. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)000\[0748:RCOTLL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[0748:RCOTLL]2.0.CO;2)

Congdon JD, Gibbons JW (1987) Morphological constraint on egg size: a challenge to optimal egg size theory? *Proceedings of the National Academy of Science* 84(12): 4145–4147. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.12.4145>

Cooper W (2005) Duration of movements as a lizard foraging movement variable. *Herpetologica* 61(4): 363–372. <https://doi.org/10.1655/04-36.1>

Cooper W, Castañeda G, García-De la Peña C, Wilson B, Caldwell J, Vitt L (2013) Foraging modes of some Jamaican, Costa Rican, and Mexican lizards. *Herpetology Notes* 6: 591–597.

Doughty P, Shine R (1998) Reproductive energy allocation and long-term energy stores in a viviparous lizard (*Eulamprus tympanum*). *Ecology* 79(3): 1073–1083. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)80\[079:REAAAL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)80[079:REAAAL]2.0.CO;2)

Du WG, Ji X, Zhang YP, Xu XF, Shine R (2005) Identifying sources of variation in reproductive and life history traits among five populations of a Chinese lizard (*Takydromus septentrionalis*, Lacertidae). *Biological Journal of Linnean Society* 85(4): 443–453. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00508.x>

Fitch HS (1970) Reproductive cycles in lizards and snakes. University of Kansas, Museum of Natural History, Miscellaneous Publications 52: 1–247.

Fitch HS (1973) A field study of Costa Rican lizards. University of Kansas, Science Bulletin 50: 39–126. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.25758>

Fitch HS (1985) Variation in clutch and litter size in New World reptiles. University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publication 76: 1–76. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.16254>

Ford NB, Seigel RA (1989) Relationships among body size, clutch size, and egg size in three species of oviparous snakes. *Herpetologica* 45(1): 75–83. <https://www.jstor.org/stable/3892220>

Galdino C, Assis V, Kiefer M, Van Sluys M (2003) Reproduction and fat body cycle of *Eurolophosaurus nanuzae* (Sauria: Tropiduridae) from a seasonal montane habitat of southeastern Brazil. *Journal of Herpetology* 37(4): 687–694. <https://doi.org/10.1670/114-02A>

Gerald G, Miskell C (2007) Small litter sizes and relative clutch mass of Northern Watersnakes (*Nerodia sipedon sipedon*) in Southwestern Ohio. *Ohio Journal of Science* 117(4): 84–85. <http://hdl.handle.net/1811/44927>

Goodman BA, Miles D, Schwarzkow L (2008) Life on the rocks: habitat use drives morphological and performance evolution in lizards. *Ecology* 89(12): 3462–3471. <https://doi.org/10.1890/07-2093.1>

- Guyer C, Donnelly M (2004) Amphibians and reptiles of la Selva Costa Rica, and the Caribbean slope. University of California Press, Berkeley, USA, 367 pp.
- Hamilton AM, Eckstut M, Klein E, Austin C (2008) Clutch size in the tropical scincid lizard *Emoia sanfordi*, a species endemic to the Vanuatu Archipelago. *Zoological Science* 25(8): 843–848. <https://doi.org/10.2108/zsj.25.843>
- Harvey PH, Pagel MD (1991) The comparative method in evolutionary biology. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University Press, 248 pp.
- Hernández-Córdoba OD, Agudelo-Valderrama O, Ospina-Fajardo JP (2012) Variación intraespecífica en el uso de percha nocturna de *Basiliscus galeritus* (Sauria: Corytophanidae) en Isla Palma, Pacífico Colombiano. *Papéis Avulsos de Zoología* 52(33): 401–409. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492012021300001>
- Hirth HF (1963) The ecology of two lizards on a tropical beach. *Ecological Monographs* 33(2): 83–112. <https://doi.org/10.2307/1948557>
- Ibarra-Manríquez G, Sínaca S (1987) Lista florística de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas. Listados Florísticos de México VII, Instituto de Biología, UNAM, México, 51 pp.
- Ji X, Brana F (2000) Among clutch variation in reproductive output and egg size in the Wall lizard (*Podarcis muralis*) from a lowland population of Northern Spain. *Journal of Herpetology* 34(1): 54–60. <https://doi.org/10.2307/1565238>
- Kiefer M, Van Sluys M, Rocha CF (2008) Clutch size and egg size of the tropical lizard *Tropidurus torquatus* (Tropiduridae) along its geographic range in coastal eastern Brazil. *Canadian Journal of Zoology* 86(12): 1376–1388. <https://doi.org/10.1139/Z08-106>
- Kratochvil L, Kubicka L (2007) Why reduce clutch size to one or two eggs? Reproductive allometries reveal different evolutionary causes of invariant clutch size in lizards. *Functional Ecology* 21(1): 171–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01202.x>
- Krisko KL, Seitz J, Townsend CJ, Enge KM (2006) The introduced brown basilisk (*Basiliscus vittatus*) in Florida. *Iguana* 13(1): 24–30.
- Laerm J (1974) A functional analysis of morphological variation and differential niche utilization in basilisk lizards. *Ecology* 55(2): 404–411. <https://doi.org/10.2307/1935228>
- Lattanzio M, LaDuke T (2012) Habitat use and activity budgets of Emerald Basilisks (*Basiliscus plumifrons*) in Northeast Costa Rica. *Copeia* 2012(3): 465–471. <https://doi.org/10.1643/CP-11-025>
- Lepage D, Lloyd P (2004) Avian clutch size in relation to rain-fall seasonality and stochasticity along an aridity gradient across South Africa. *Ostrich* 75(4): 259–268. <https://doi.org/10.2989/00306520409485453>
- Lieberman A (1980) Nesting of the Basilisk Lizard (*Basiliscus basiliscus*). *Journal of Herpetology* 14(1): 103–105. <https://doi.org/10.2307/1563894>
- Ljubisavljević K, Glasnović P, Kalan K, Kryštufek B (2012) Female reproductive characteristics of the Horvath's rock lizard (*Iberolacerta horvathi*) from Slovenia. *Archives of Biological Sciences* 64(2): 639–645. <https://doi.org/10.2298/ABS1202639L>
- Martín PS (1958) A biogeography of reptiles and amphibians in the Gomez Farias Region, Tamaulipas, Mexico. Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan. No. 101, 118 pp. <https://doi.org/10.3998/mpub.9690701>
- Meiri S, Brown JH, Sibly RM (2012) The ecology of lizard reproductive output. *Global Ecology and Biogeography* 21(5): 592–602. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00700.x>
- Mesquita D, Costa GC, Colli R, Costa TB, Shepard DB, Vitt LJ, Pianka ER (2016) Life-history patterns of lizards of the world. *The American Naturalist* 187(6): 689–705. <https://doi.org/10.1086/686055>
- Orrell K, Congdon J, Jenssen T, Michener R, Kunz T (2004) Intersexual differences in energy expenditure of *Anolis carolinensis* lizards during breeding and postbreeding seasons. *Physiological and Biochemical Zoology* 77(1): 50–64. <https://doi.org/10.1086/383497>
- Ortleb E (1965) Hatching of basilisk eggs. *Herpetologica* 20(4): 277–279. <https://www.jstor.org/stable/3890940>
- Pianka E, Parker WS (1975) Ecology of horned lizards: a review with special reference to *Phrynosoma platyrhinos*. *Copeia* 1975(1): 141–162. <https://doi.org/10.2307/1442418>
- Qualls CP, Shine R (1995) Maternal body volume as a constraint on reproductive output in lizards: evidence from the evolution of viviparity. *Oecologia* 103(1): 73–78. <https://doi.org/10.1007/BF00328427>
- Radder R, Shanhbag B (2003) Interrelationships among reproductive traits of female lizards, *Sitana ponticeriana* (Cuvier). *Current Science* 85(1): 89–91. <https://www.jstor.org/stable/24107720>
- Radder R, Shanhbag B (2004) Factors influencing offspring traits in oviparous multi-clutched lizard, *Calotes versicolor* (Agamidae). *Journal of Bioscience* 29(1): 105–110. <https://doi.org/10.1007/BF02702567>
- Ramírez-Bautista A, Balderas-Valdivia C, Vitt LJ (2000) Reproductive ecology of the whiptail lizard *Cnemidophorus lineatissimus* (Squamata: Teiidae) in a tropical dry forest. *Copeia* 2000(3): 712–722. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)000\[0712:REOTWL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[0712:REOTWL]2.0.CO;2)
- Ream CH (1965) Notes on the behavior and egg laying of *Corytophanes cristatus*. *Herpetologica* 20(4): 239–242. <https://www.jstor.org/stable/3890933>
- Rodríguez-Romero F, Méndez-De la Cruz FR, López-González L (2005) Análisis comparado del esfuerzo reproductor en algunos lacertilios mexicanos de ambientes tropical y templado. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 2: 168–177. <http://repositorio.fcien-cias.unam.mx:8080/jspui/bitstream/11154/143493/1/2V3EAnalisis-Comparado.pdf>
- Rutherford PL (2004) Proximate mechanisms that contribute to female-biased sexual size dimorphism in an anguid lizard. *Canadian Journal of Zoology* 82(5): 817–822. <https://doi.org/10.1139/z04-063>
- Scharf I, Feldman A, Novosolov M, Pincheira-Donoso D, Das M, Uetz P, Torres-Carvajal O, Bauer A, Roll U, Meiri S (2015) Late bloomers and baby boomers: ecological drivers of longevity in squamates and the tuatara. *Global Ecology and Biogeography* 24(4): 396–405. <https://doi.org/10.1111/geb.12244>
- Seigel R, Fitch H (1984) Ecological patterns of relative clutch mass in snakes. *Oecologia* 61(3): 293–301. <https://doi.org/10.1007/BF00379625>
- Shanhbag BA, Radder RS, Saidapur SK (2000) Maternal size determines clutch mass, whereas breeding timing influences clutch and egg size in the tropical lizard, *Calotes versicolor* (Agamidae). *Copeia* 2000(4): 1062–1067. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)000\[1062:MSDCMW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)000[1062:MSDCMW]2.0.CO;2)
- Shine R (1980) “Cost” of reproduction in reptiles. *Oecologia* 46(1): 92–100. <https://doi.org/10.1007/BF00346972>
- Shine R (1992) Relative clutch mass and body shape in lizards and snakes: is reproductive investment constrained or optimized? *Evolution* 46(3): 828–833. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb02088.x>
- Shine R, Greer AE (1991) Why are clutch sizes more variable in some species than in others? *Evolution* 45(7): 1696–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1991.tb02675.x>

- Shine R, Downes SJ (1999) Can pregnant lizards adjust their offspring phenotypes to environmental conditions? *Oecologia* 119(1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s004420050754>
- Stearns SC (1992) The evolution of life histories. Oxford University, USA, 264 pp.
- Stuart-Smith J, Swain R, Stuart-Smith RD, Wapstra E (2007) Is fecundity the ultimate cause of female biased size dimorphism in a dragon lizard? *Journal of Zoology* 273(3): 266–272. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2007.00324.x>
- Suárez-Rodríguez O, Suárez-Varón G, Chávez-Siles F, Pérez-Arriaga F, Andrade-Soto G, Aguilar-Isaac L, Sherbrooke WC, Hernández-Gallegos O (2018) Masa relativa de la camada en *Phrynosoma orbiculare* (Squamata: Phrynosomatidae) en el Parque Estatal Sierra Morelos, Toluca, Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 89(1): 282–289. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.1.1925>
- Suárez-Varón G (2015) Ecología de *Basiliscus vittatus* (Squamata, Corytophanidae): estructura poblacional y proporción sexual. Bachelor thesis. Universidad Autónoma del Estado de México, México, 39 pp.
- Suárez-Varón G, Suárez-Rodríguez O, Gribbins KM, Hernández-Gallegos O (2016) *Basiliscus vittatus*. Oviposition site. *Mesoamerican Herpetology* 3(4): 1006–1007.
- Tinkle DW (1969) The concept of reproductive effort and its relation to the evolution of life histories of lizards. *The American Naturalist* 103(933): 501–516. <https://doi.org/10.1086/282617>
- Tinkle DW, Wilbur HM, Tilley SG (1970) Evolutionary strategies in lizard reproduction. *Evolution* 24(1): 55–74. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01740.x>
- Van Devender RW (1982) Demography of the lizard *Basiliscus basiliscus*. *Herpetologica* 38(1): 189–208. <https://www.jstor.org/stable/3892373>
- Vaughan C, Ramirez O, Herrera G, Fallas E, Henderson RW (2007) Home range and habitat use of *Basiliscus plumifrons* (Squamata: Corytophanidae) in an active Costa Rican cacao farm. *Applied Herpetology* 4(3): 217–226. <https://doi.org/10.1163/157075407781268327>
- Vitt LJ (1977) Observation on clutch size and egg size and evidence for multiple clutches in some lizards of southwestern United States. *Herpetologica* 33(3): 333–338. <https://www.jstor.org/stable/3891949>
- Vitt LJ (1981) Lizard reproduction: habitat specificity and constraints on relative clutch mass. *The American Naturalist* 117(4): 506–514. <https://doi.org/10.1086/283731>
- Vitt LJ, Congdon JD (1978) Body shape, reproductive effort and relative clutch mass in lizards: resolution of a paradox. *The American Naturalist* 112(985): 595–608. <https://doi.org/10.1086/283300>
- Vitt LJ, Price HJ (1982) Ecological and evolutionary determinants of relative clutch mass in lizards. *Herpetologica* 38(1): 237–255. <https://www.jstor.org/stable/3892377>
- Vitt LJ, Goldberg SR (1983) Reproductive ecology of two tropical iguanid lizards: *Tropidurus torquatus* and *Platymotus semitaeniatus*. *Copeia* 1983(1): 131–141. <https://doi.org/10.2307/1444707>
- Warner DA, Bonnet X, Hobson KA, Shine R (2008) Lizards combine stored energy and recently acquired nutrients flexibly to fuel reproduction. *Journal of Animal Ecology* 77(6): 1242–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01442.x>
- Wen-San Huang (2010) Ecology and reproductive characteristics of the skink *Sphenomorphus incognitus* on an East Asian Island, with comments on variations in clutch size with reproductive modes in *Sphenomorphus*. *Zoological Studies* 49(6): 779–788. <http://zoology.tud.sinica.edu.tw/Journals/49.6/779.pdf>
- Wilkinson LR, Gibbons JW (2005) Patterns of reproductive allocation: clutch and egg size variation in three freshwater turtles. *Copeia* 2005(4): 868–879. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2005\)005\[0868:PORACA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2005)005[0868:PORACA]2.0.CO;2)
- Williams GC (1966) Adaptation and natural selection. Princeton University Press, New Jersey, 320 pp.
- Zamora-Abrego JG, Zuñiga-Vega JJ, Nieto-Montes de Oca A (2007) Variation in reproductive traits within the lizards genus *Xenosaurus*. *Journal of Herpetology* 41(4): 630–637. <https://doi.org/10.1670/06-266.1>
- Zar JH (1999) Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey, 663 pp.

Capítulo 2

Estadio embrionario a la oviposición

Variación del estadio embrionario de *Basiliscus vittatus*
(Squamata: Corytophanidae) en la oviposición



Revista Mexicana de Biodiversidad
Universidad Nacional Autónoma de México

Gabriel Suárez-Varón
Facultad de Ciencias,
Universidad Autónoma del Estado de México

Cd. Universitaria, a 08 de marzo de 2021.

Estimado M. en C. Suárez:

Después de revisar la versión corregida de su trabajo ID-3795: "Variación en el estadio embrionario a la oviposición de *Basiliscus vittatus* (Squamata: Corytophanidae)", en coautoría con Diego Cortez, Maricela Villagrán-Santa Cruz, Ulises Rojas-Hernández y Oswaldo Hernández-Gallegos, le informo que ha sido aceptado para su publicación en nuestra revista y aparecerá próximamente, bajo nuestro sistema de publicación continua.

Con el fin de garantizar la adecuada reproducción de las figuras en la impresión final, es necesario que envíe las figuras en formato **Tiff**, a **300 dpi**, a nuestra Ed. Técnica, la maestra Ma. Antonieta Arizmendi Espinosa (aarizmen@ib.unam.mx).

En cuanto tengamos listas las pruebas de galeras se las haremos llegar para una última revisión. Le reitero nuestra invitación a enviar fotografías relacionadas con su trabajo para la selección de imágenes que aparecerán en la portada correspondiente.

Sin más por el momento, reciba saludos cordiales

Atentamente,

Dr. Fernando Álvarez
Editor responsable

Variación del estadio embrionario de *Basiliscus vittatus* (Squamata: Corytophanidae) en la oviposición

Variation of the embryonic stage of *Basiliscus vittatus* (Squamata: Corytophanidae) at oviposition

Gabriel Suárez-Varón ^{a, *}, Diego-Cortez ^b, Maricela Villagrán-Santa Cruz ^c, Ulises Rojas-Hernández ^a y Oswaldo Hernández-Gallegos ^a

^a Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Herpetología, Instituto Literario # 100, 50000 Toluca, Estado de México, México

^b Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Genómicas, Avenida Universidad # 2001, 62210, Cuernavaca, Morelos, México

^c Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Comparada, Laboratorio de Biología Tisular y Reproductora, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México

*Autor para correspondencia: biogabrielsv@gmail.com (G. Suárez-Varón)

Recibido: 20 octubre 2020; aceptado: 3 marzo 2021

Resumen

En lagartijas ovíparas existe un intervalo frecuente en el desarrollo embrionario que alcanzan los huevos al momento de la oviposición entre el estadio 26 y 33. Dicha variación se ha relacionado con el origen de la viviparidad y permite la exploración de los efectos experimentales en el desarrollo embrionario después de la oviposición. Sin embargo, para la mayoría de las especies de lagartijas, el estadio embrionario en la oviposición es desconocido. El presente estudio detalla por primera vez en Corytophanidae el estadio embrionario en la oviposición de *Basiliscus vittatus*. Se colectaron hembras grávidas para obtener nidadas de reciente oviposición. De cada nidada, un huevo al azar fue disecado con la finalidad de determinar el estadio embrionario en la oviposición, además de medir variables morfométricas de la hembra y de los huevos. Los resultados muestran que en *B. vittatus*, las hembras ovipositan en 4 estadios embrionarios: 29 a 32; sin embargo, existe una preferencia por ovipositar en estadios embrionarios intermedios (estadios 30 y 31). De las diferentes variables registradas, el estadio en la oviposición solo se asocia con el largo máximo del huevo. El estadio en la oviposición de *B. vittatus* parece estar relacionado con factores fisiológicos y morfológicos de las hembras, así como por su estrategia de forrajeo.

Palabras clave: Corytophanidae; Desarrollo; Estadio embrionario; Oviposición

Abstract

In oviparous lizard species there is a frequent interval in the embryonic development that the eggs reach at the time of oviposition between stage 26 and 33. This variation has been related to the origin of viviparity and allowing exploration of the effects of specific experimental conditions on embryonic development after oviposition. However, for most species of lizards the embryonic stage at oviposition is unknown. The present study details for first time in Corytophanidae the embryonic stage at oviposition of *Basiliscus vittatus*. Gravid females were collected to obtain recently oviposited clutches. From each clutch, a random egg was dissected in order to determine the embryonic stage at oviposition, in addition to measuring morphometric variables of the female and the eggs. Our results show that in *B. vittatus*, females oviposit in 4 embryonic stages: 29 to 32; however, there is a preference for ovipositing in intermediate embryonic stages (stages 30 and 31). Of the different variables recorded, the stages at oviposition are associated with the maximum length of the egg. The stage at oviposition of *B. vittatus* seems to be related to physiological and morphological factors of the females, as well as their foraging strategy.

Keywords: Corytophanidae, Development, Embryonic stage, Oviposition.

Introducción

Muchos aspectos que integran la biología de las lagartijas se enfocan en partes del ciclo de vida que contemplan estadios postoviposición como la ecología o características de historia de vida (Andrews et al., 2017; Granados-González et al., 2020; Woolrich-Piña et al., 2020). El desarrollo embrionario es un proceso que inicia con la fecundación y finaliza con el nacimiento (Andrews, 2002). Muchas investigaciones han estudiado cómo la temperatura afecta el desarrollo embrionario, la capacidad de retención embrionaria e incluso las estrategias ecológicas y variaciones filogenéticas en los escamados (Andrews et al., 2013; Andrews y Rose, 1994; Braña et al., 1991; García-Collazo et al., 2012). Dichos estudios han modelado hipótesis sobre el desarrollo embrionario y, particularmente, sobre el origen de la viviparidad en reptiles a partir de sus conspecíficos ovíparos (Andrews et al., 2013). La hipótesis del surgimiento de la viviparidad ha sido apoyada por estudios sobre la retención embrionaria, estrés hídrico, grosor del cascarón, temperatura y, con menor énfasis, el estadio embrionario en la oviposición (Andrews y Mathies, 2000; Andrews y Rose, 1994; Andrews et al., 2017; Calderón-Espinosa et al., 2006; Heulin et al., 2002; Meza-Lázaro, 2004; Rafferty y Reina, 2012; Shine, 1983).

El desarrollo embrionario ha sido descrito y dividido para su estudio siguiendo los rasgos morfológicos que presenta el embrión. Se han generado tablas de desarrollo embrionario que permiten seguir y definir los estadios durante el desarrollo (Py-Daniel et al., 2017). Tradicionalmente, la tabla de desarrollo más utilizada en estudios experimentales como un punto de comparación embriológica y para determinar el estadio del desarrollo embrionario en lacertilios (Andrews et al., 2008; Hopwood, 2007; Py-Daniel et al., 2017) es la descrita por Dufaure y Hubert

(1961). Esta tabla incluye 40 estadios e inicia desde el clivaje (estadio 1), y culmina con el embrión formado completamente previo a la eclosión o nacimiento (estadio 40).

El proceso de oviposición involucra una transición de la embriogénesis dentro del oviducto de la madre y el nido (Andrews y Mathies, 2000). En reptiles ovíparos existe una variación considerable en el desarrollo embrionario que alcanzan los huevos al momento de la oviposición (Heulin et al., 2002). Por ejemplo, la oviposición en estadios tempranos de desarrollo es común en Crocodylia (néurula, Ferguson, 1985), Testudines y Rhyncocephalia (ambos en gástrula, Ewert, 1985; Moffat, 1985). En lacertilios existen especies que ovipositan tempranamente (*Chamaeleo lateralis*, estadio 8, Blanc, 1974) y otros que lo hacen cuando el embrión ha alcanzado un desarrollo prácticamente completo (estadio 39.5, DeMarco, 1993; García-Collazo et al., 2012; Mathies y Andrews, 1996). También se han observado variaciones intraespecíficas y entre nidadas en el estadio embrionario en la oviposición (Braña et al., 1991; Calderón-Espinoza et al., 2006). Pese a esta variación, la mayoría de los lacertilios ovipositan en el estadio 30 (basados en la tabla de desarrollo embrionario de Dufaure y Hubert [1961]), el cual es considerado el más frecuente al momento de la oviposición en reptiles (Mathies y Andrews, 1999). En el estadio 30, el embrión está al inicio del segundo tercio del desarrollo embrionario completo y se encuentra entre el intervalo de estadios 26 a 32, donde ocurre la deposición de calcio para formar por completo el cascarón, además de la incorporación de proteínas como el albumen para que el huevo pueda continuar su desarrollo expuesto al medioambiente (Andrews y Mathies, 2000; Shine, 1983).

Un aspecto importante al realizar estudios experimentales en huevos de reptiles es conocer el estadio normal de oviposición, como en el trabajo de Rodríguez-Díaz y Braña (2012). Este trabajo describe que al analizar nidadas de *Zootoca vivipara*

en el mismo estadio en la oviposición (33) se puede observar una eclosión más temprana (días de incubación) como consecuencia de experimentar con elevación y temperatura de incubación. Entonces, el estadio embrionario en la oviposición permite tener un control y un panorama amplio de los efectos experimentales resultantes, así como de las hipótesis a explorar. La ausencia de esta información en diversos experimentos de incubación puede generar sesgos que podrían sobre-estimar efectos experimentales (e.g., térmicos, hídricos, retención embrionaria) al que los huevos y hembras grávidas son sometidos, forzando la detección de similitudes o diferencias no existentes o que no son apoyadas metodológicamente (Andrews, 2004). Entonces, el conocimiento del estadio embrionario en la oviposición debe ser una característica necesaria de análisis para poner a prueba diversas hipótesis como el origen de la viviparidad. Por ejemplo, en tortugas, cocodrilos y tuátaras dados los tempranos estadios embrionarios en la oviposición que presentan se puede inferir por qué en estos grupos no surgió la viviparidad, mientras que en escamados, a pesar de las variaciones existentes en el desarrollo embrionario, la viviparidad ocurrió en múltiples ocasiones (Andrews, 1997; Qualls et al., 1997; Shine, 1983).

En el trabajo de Andrews y Mathies (2000), se conocía el estadio en la oviposición de aproximadamente 1.1% de las especies de escamados (i.e., 63 especies de las ~ 5,500 especies de escamados ovíparos descritos en aquel momento). Desde entonces se ha incrementado el número a 25 especies adicionales para alcanzar solo 1.3% de las especies de escamados (i.e., 88 especies de las 6,905 especies de lacertilios descritos en la actualidad; Uetz et al., 2021). Asimismo, se han descrito diversos factores que pueden afectar el estadio en la oviposición, éstos incluyen aspectos morfológicos, fisiológicos y ecológicos. Dentro de los factores morfológicos más importantes se encuentra el grosor y estructura del cascarón, la

vascularización de membranas extraembrionarias y del oviducto (Andrews, 1997; Masson y Guillette, 1987; Packard y DeMarco, 1991). Entre los factores fisiológicos, se encuentra la disponibilidad de oxígeno y de agua en el oviducto (Mathies y Andrews, 1996; Smith et al., 2015). Ambos factores promueven variaciones en la difusión de gases y, por consiguiente, en la cantidad de oxígeno disponible para los huevos en el oviducto (Masson y Guillette, 1987). Finalmente, existen factores ecológicos que afectan el estadio en la oviposición, como la retención de los huevos en el oviducto por periodos más largos de tiempo para aumentar la sobrevivencia de la descendencia o, por el contrario, ovipositar tempranamente para reducir las tasas de mortalidad de las hembras grávidas al disminuir el exceso de carga y aumentar su capacidad de escape ante un depredador (Andrews y Mathies, 2000; Sinervo y Licht, 1991).

Basiliscus vittatus es una lagartija ovípara que presenta un modo de forrajeo pasivo (Cooper et al., 2013); no obstante, se ha sugerido que al mostrar características como altas velocidades de escape, cuerpos cilíndricos y valores de masa relativa de la nidada (MRN) comparables con especies de forrajeo activo (e.g. *Aspidoscelis*), pueda encontrarse en una posición intermedia entre ambos extremos de forrajeo (Suárez-Varón et al., 2019). Por otra parte, aunque recientemente se dieron a conocer diversas características de la nidada y de las crías (Suárez-Varón, 2017; Suárez-Varón et al., 2019), no hay información disponible del estadio embrionario al momento de la oviposición para esta lagartija. En el presente estudio aportamos información, por primera vez para la familia Corytophanidae, del estadio embrionario en la oviposición de *B. vittatus*. Este trabajo, a diferencia de estudios previos (Hernández-Gallegos et al., 2011; Manríquez-Morán et al., 2005), incluye un tamaño de muestra significativo. El estadio en la oviposición de *B. vittatus* podría ser

de gran utilidad para entender el papel de la temperatura en el desarrollo embrionario y en la determinación del sexo en *B. vittatus*.

Materiales y métodos

Se recolectaron hembras grávidas de *B. vittatus* durante la temporada reproductora de 2019, la cual corresponde a los meses desde abril a julio en La Selva del Marinero localizada en el municipio de Catemaco, Veracruz (18°26'36.3" N, 94°37'81.9" O, 177 m snm) (Suárez-Varón et al., 2019). La captura se llevó a cabo bajo el permiso de colecta científica SEMARNAT-08-043. La zona de estudio presenta selva alta perennifolia como vegetación y un clima cálido-húmedo con una marcada estacionalidad que comprende una estación lluviosa de junio a febrero y un periodo de sequía de marzo a mayo (Ibarra-Manríquez y Sinaca, 1987; Urbina-Cardona et al., 2006). Las hembras fueron capturadas manualmente y, en ocasiones, con una caña de pescar en sitios donde es común observarlas.

La condición reproductora se valoró al recolectar las hembras mediante una palpación abdominal (Cuellar, 1984). A las hembras que presentaron huevos se les registró la fecha de colecta, la longitud hocico-cloaca (LHC; precisión 0.01 mm) y la masa corporal (MC; precisión 0.1 g). Las hembras fueron transportadas al Laboratorio de Herpetología en la Universidad Autónoma del Estado de México, donde fueron mantenidas individualmente en terrarios de 1 m × 50 cm × 50 cm (largo, ancho y alto), provistos de suelo proveniente del área de estudio y lámparas incandescentes de 75 watts en un extremo del mismo para crear un gradiente térmico entre 20 y 40 °C. Las hembras se alimentaron cada tercer día con larvas de tenebrio (*Tenebrio molitor*) y se les proporcionó agua *ad libitum*. Los terrarios se revisaron diariamente cada 3 horas (8:00 a 20:00 h) a través de un orificio lateral que ocultaba la presencia del observador,

para determinar la flacidez abdominal de las hembras como señal de oviposición o la observación *in situ* de los huevos.

Los huevos fueron colectados el día de la oviposición, esta fecha se utilizó para determinar el número de días preoviposición (DPO) como los días transcurridos desde la colecta de la hembra grávida hasta la oviposición de cada hembra. Se tomó un huevo aleatoriamente de cada nidada y se registró su masa (MH), así como largo y ancho máximo (LM y AM, respectivamente) y su volumen al momento de la oviposición (VH) estimado por la ecuación: $V = 4/3 \pi (1/2 LM) (1/2 AM)^2$. Posteriormente, los huevos fueron fijados en formaldehído (10%) para preparar las muestras y poder determinar el estadio de desarrollo embrionario en la oviposición basados en la tabla de desarrollo embrionario propuesta por Dufaure y Hubert (1961). Adicionalmente, algunos valores de las variables de la masa relativa de la nidada (MRN), AM y LM fueron tomados de Suárez-Varón et al. (2019) y complementados con nueva información generada de las variables medidas en el presente estudio.

Con los datos obtenidos se realizaron pruebas de normalidad para todas las variables y se aplicaron regresiones lineales para comprobar si existe alguna relación entre las características de las hembras (LHC, MC, DPO, MRN) y de los huevos (AM, LM y VH) respecto al estadio embrionario en la oviposición (EO). Por otra parte, se realizó una prueba de Chi cuadrada con la finalidad de determinar si existe un estadio embrionario en la oviposición seleccionado con mayor frecuencia en el proceso de oviposición de *B. vittatus* (Zar, 1999). Todos los análisis fueron realizados con un alfa de 0.05 en el software SPSS.

Resultados

Fueron colectadas un total de 37 hembras grávidas. Los datos sobre su morfología y la de los huevos se muestran en la Tabla 1. Los estadios embrionarios en la oviposición de *B. vittatus* fueron: 29 (n = 3), 30 (n = 14), 31 (n = 14) y 32 (n = 6) con una media que corresponde al estadio 30.6 ± 0.14 EE. Durante el estadio 29 se observó el inicio de la diferenciación de las extremidades con forma de muñón y 40 pares de somitas. Mientras que en el estadio 30 se observó un muñón más desarrollado con una cresta pequeña, ligera pigmentación del ojo y las 5 hendiduras branquiales se encontraron abiertas (Fig. 1A). Durante el estadio 31 las extremidades en forma de muñón comenzaron a aplanarse en la zona más distal formando el autopodio, ojos prominentes y más pigmentados (Fig. 1B). En el estadio 32 los embriones tenían diferenciados el zeugopodio y estilopodio en las extremidades (Fig. 1C).

La prueba de Chi cuadrada se utilizó para probar el modelo correspondiente a ovipositar en estadios intermedios (30 y 31) o extremos (29 y 32), de acuerdo con los estadios embrionarios obtenidos. Dicha prueba mostró que existe una preferencia por ovipositar en estadios embrionarios intermedios (i.e., 30-31; $X^2 = 9.7$, *g.l.* = 1, $p = 0.001$). Adicionalmente, los análisis de regresión lineal señalaron que el estadio embrionario en la oviposición se asocia con el largo máximo del huevo ($EO = 23.3864 + 0.372561 * LM$, $r = 0.54$, $p = 0.005$), pero no con la MRN u otras características (Tabla 2), mientras el volumen del huevo se correlaciona positivamente con el ancho máximo ($VH = -1172.87 + 219.13 * AM$, $r = 0.86$, $p = 0.0001$).

Tabla 1. Estadística descriptiva de la morfología corporal de las hembras: longitud hocico cloaca (LHC), masa corporal (MC), días preoviposición (DPO), masa relativa de la nidada (MRN) y huevos al momento de la oviposición: estadio embrionario (EO), largo máximo (LM), ancho máximo (AM) y volumen (VH) de *Basiliscus vittatus* de La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz.

Característica	Media	EE	Min	Max	CV %	N
Estadio embrionario	30.6	0.14	29	32	2.8	37
LHC (mm)	126.9	1.2	106	139.1	6.07	37
MC (g)	57.4	1.9	37	87	20.2	37
MRN	0.18	0.006	0.06	0.27	21.8	37
LM (mm)	19.43	0.21	16.4	22.27	6.57	37
AM (mm)	11.25	0.12	9.74	12.72	6.69	37
VH (mm ³)	1284.22	31.6	899.17	1745.74	14.9	37
DPO	41.18	3.11	8.0	95.0	45.9	37

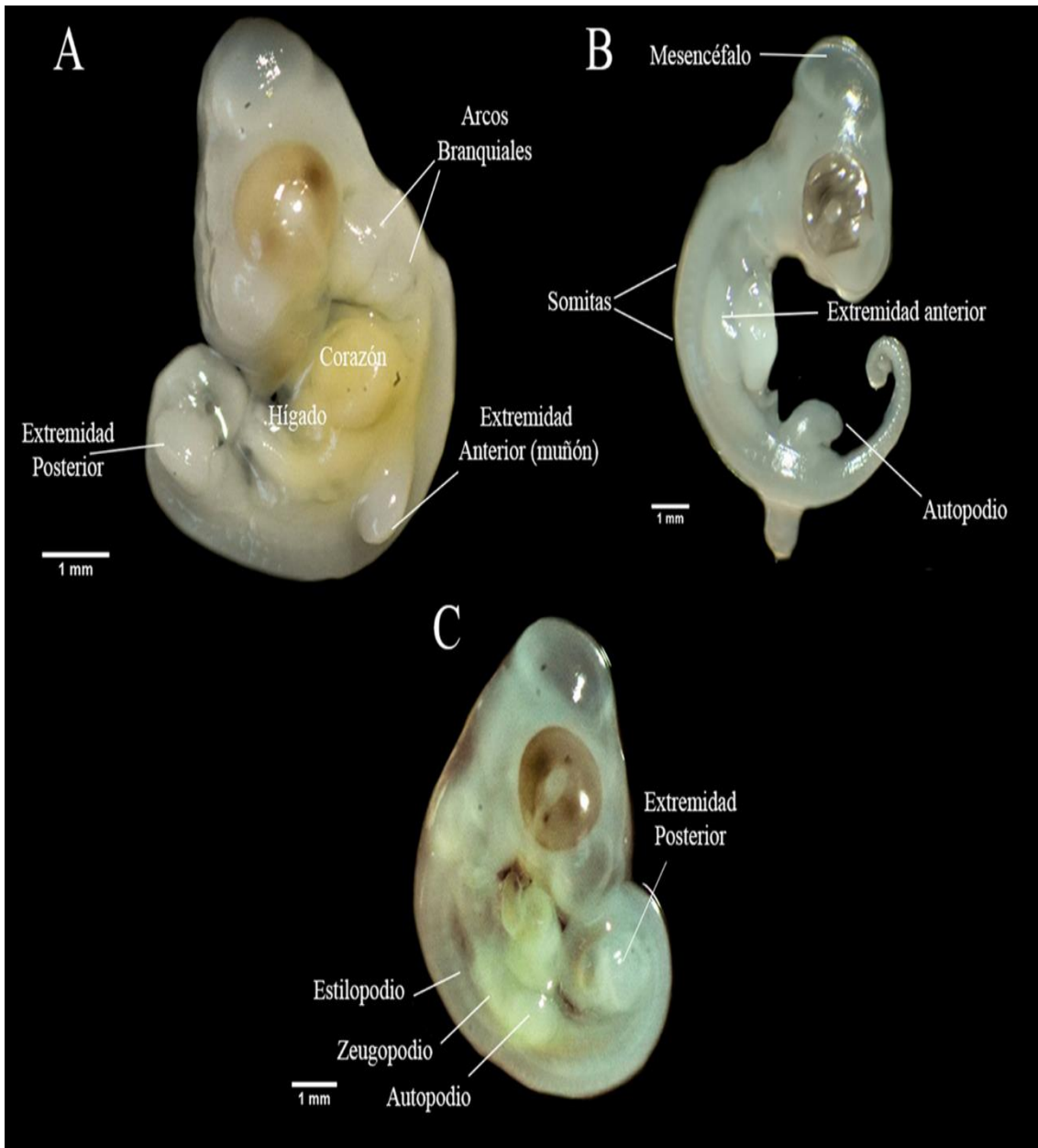


Figura 1. Estadios embrionarios al momento de la oviposición de *Basiliscus vittatus* de La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz. (A) Estadio 30, (B) estadio 31 y (C) estadio 32.

Tabla 2. Regresiones lineales entre características de la hembra: longitud hocico cloaca (LHC), masa corporal (MC), días preoviposición (DPO), masa relativa de la nidada (MRN) y de los huevos: largo máximo (LM), ancho máximo (AM) y volumen (VH) del estadio embrionario de *Basiliscus vittatus* al momento de la oviposición (EO) en La Selva del Marinero, Catemaco, Veracruz.

Característica	<i>r</i>²	<i>p</i>
LHC vs EO	0.97	0.56
MC vs EO	0.10	0.54
LM vs EO	0.29	0.005
AM vs EO	0.01	0.94
VH vs EO	0.74	0.61
MRN vs EO	0.07	0.871
DPO vs EO	0.07	0.875

Discusión

Si bien, el grado del desarrollo embrionario alcanzado en la oviposición varía entre reptiles, un patrón común para escamados es ovipositar en el estadio 30 (Andrews y Mathies, 2000). En este sentido, los resultados del presente estudio indican que, aunque el estadio a la oviposición es variable en *B. vittatus* (29-32), las hembras ovipositan preferencialmente en los estadios 30 y 31. Dichos estadios parecen ser un aspecto recurrente en la mayoría de las lagartijas que dejan una nidada anual, como ocurre en *Lampropholis delicata* (Andrews y Mathies, 2000; Andrews et al., 2017; Shine, 1983). Estadios embrionarios más allá del 32 requieren la capacidad de las hembras para retener sus huevos en el oviducto por largos periodos y, en consecuencia, se esperaría que un estadio embrionario más avanzado al momento de la oviposición sea reflejo de una duración mayor en el tiempo (días) de retención de los huevos en el oviducto (Heulin et al., 2002; Shine, 1983). En este aspecto, los días preoviposición (DPO) no mostraron relación con el estadio embrionario en la oviposición, esto explica que la variación embrionaria es debida a la influencia de factores fisiológicos y ambientales y no al estrés del cautiverio. Y, aunque se ha documentado variación intranidada en algunas especies de lagartijas (Calderón-Espinoza et al., 2006), en *B. vittatus* la evidencia de 2 nidadas que fueron encontradas en campo (misma zona de estudio) y cuyos embriones se encontraron en el mismo estadio embrionario (n = 5, estadio 38, n = 6, estadio 39, Suárez-Varón, obs. pers.), sugiere que los huevos son ovipositados en el mismo estadio embrionario. De este modo, *B. vittatus* posee la capacidad de retener huevos más allá de la moda del estadio normal de desarrollo embrionario (30), pero no después del intervalo máximo (32). Esto implica una retención de 14.4 días que corresponden al tiempo del desarrollo embrionario desde el estadio 29 al 32 (Suárez-Varón, datos no publicados)

respecto a un nido de reciente oviposición encontrado en campo con una temperatura de 28 °C (Suárez-Varón et al., 2016). Entonces, aunque en esta población es poco probable que las hembras tengan más de una nidada, como sucede en poblaciones de *B. vittatus* que se distribuyen más al sur y donde las condiciones ecológicas permiten que la reproducción ocurra durante todo el año, la evidencia actual indica que en la población estudiada existe una sola nidada que se extiende de marzo a julio (Hirth, 1963; Suárez-Varón, 2015). Esta característica favorece la presencia de estadios embrionarios en la oviposición que rondan el estadio 30, contrario a aquellas especies con múltiples nidadas por año, donde los huevos pueden ser ovipositados en estadios más tempranos de desarrollo (Andrews y Mathies, 2000).

La oviposición de los huevos en estadios embrionarios más tempranos a los que presenta *B. vittatus* se ha relacionado con una disminución en los costos asociados al modo de forrajeo activo, ya que, retener por más tiempo los huevos dentro los oviductos representa mayor riesgo de depredación para la hembra e incluso compromete la sobrevivencia de la descendencia (Braña et al., 1991; Vitt y Congdon, 1978; Vitt y Price, 1982). Por ello, probablemente la presión selectiva debió favorecer aquellas especies con forrajeo activo para que desarrollaran una oviposición tan pronto como la formación del cascarón estuviera completa, aunque esto implicara dejar huevos en un estadio embrionario temprano (Mathies y Andrews, 1999). Por ejemplo, como consecuencia de un forrajeo activo, varias especies de teiidos dejan sus huevos más tempranamente que *B. vittatus*, 21-22 como ocurre en *Aspidoscelis uniparens* (Billy, 1988), 18 para *Aspidoscelis sacki* (Hernández-Gallegos et al., 2011), 18 *Aspidoscelis costatus costatus* (López-Moreno, 2011). Esto es contrario a lo que ocurre en algunas especies con forrajeo pasivo, donde la capacidad de retención embrionaria permite llegar a estadios de desarrollo tardíos (e.g., como sucede en

Sceloporus scalaris, 39.5 [Mathies y Andrews, 1996] y *Sceloporus aeneus* 39 [García-Collazo et al., 2012]).

Por otra parte, el máximo estadio embrionario en la oviposición de *B. vittatus* debe estar limitado por las demandas de oxígeno del embrión en el oviducto al presentar un estadio mayor de desarrollo, ya que después del estadio 30 comienza una fase de crecimiento exponencial del embrión, durante el cual los tractos reproductores no pueden continuar la embriogénesis como sucede en otras lagartijas (Andrews, 2002; Braña et al., 1991; Shine, 1983). Por lo tanto, se ha sugerido que valores bajos de oxígeno (hipoxia) en los oviductos limitan el intercambio gaseoso; siendo la hipoxia una de las condiciones que mejor explican las limitantes del desarrollo y metabolismo embrionario (Andrews, 2002; Andrews y Mathies, 2000; Rafferty et al., 2013). Además, la concentración de oxígeno en el oviducto también ha sido ligada a temperaturas ambientales que favorecen aquellas especies distribuidas en climas fríos y con forrajeo pasivo (García-Collazo et al., 2012; Mathies y Andrews, 1996). Por lo que, el máximo estadio a la oviposición es producto del tiempo que las hembras pueden retener los huevos dentro el oviducto (Shine y Bull, 1979).

Los análisis de regresión lineal mostraron que un incremento en el largo máximo de los huevos proporciona un desarrollo embrionario más avanzado. Esto implica una distensión abdominal de las hembras para permitir el mantenimiento de los huevos durante un lapso mayor que en el caso de *B. vittatus*, correspondería a máximo 2 estadios embrionarios pasando la fase normal de oviposición. Mientras que el volumen y el ancho máximo permanecen estables dado que no se asociaron con el estadio embrionario en la oviposición, pero sí entre ellas. El aumento en estas características (AM y VH) por la adición de agua y crecimiento del embrión incrementaría los costos (e.g., mortalidad, fisiológicos) relacionados con la retención

de huevos, reduciendo así la cantidad y presión del oxígeno disponible e induciendo a la hipoxia (Braña et al., 1991; Rafferty et al., 2013). Parece ser que la morfología de *B. vittatus* limita el tamaño de los huevos (e.g., especialmente su ancho y volumen), dado que su volumen está en función del ancho máximo; es decir, el ancho máximo limita el incremento del volumen. Como consecuencia, mantener los huevos por más tiempo dificultaría el proceso de oviposición debido a la pequeña apertura cloacal que poseen las hembras (Suárez-Varón et al., 2019).

Un estudio previo ha registrado cómo en *B. vittatus* la MRN se correlaciona con el tamaño de nidada (media = 6.2 huevos) y cómo el tamaño de la nidada y el volumen de los huevos están limitados por la LHC de las hembras (ver Figs. 2, 3 en Suárez-Varón et al. [2019]). En el presente estudio, la ausencia de correlación de la MRN con EO sugiere que la energía que las hembras destinan a la reproducción no influye sobre el estadio embrionario en la oviposición, contrario a los hallazgos en diferentes especies de *Lacerta*, donde valores mayores en MRN corresponden a estadios embrionarios más avanzados (Braña et al., 1991). Además, las limitaciones impuestas en el volumen y ancho máximo de los huevos son un indicativo de que el crecimiento, tamaño del huevo, y por tanto, el estadio embrionario en la oviposición, son limitados por la morfología corporal de las hembras y los requerimientos fisiológicos dentro los oviductos para continuar el desarrollo embrionario (Andrews, 2002).

Adicionalmente, características como la velocidad de escape, las tasas de depredación y las conductas asociadas al forrajeo pasivo reflejarían altos valores en la MRN y, por tanto, la capacidad de una mayor retención embrionaria (Braña et al., 1991; Vitt y Price, 1982). Estas condiciones favorecerían encontrar estadios en la oviposición avanzados en el desarrollo embrionario, contrario a lo que ocurre con *B.*

vittatus y en la mayoría de las especies, que no muestran una prolongada retención embrionaria.

La familia Corytophanidae incluye 3 géneros, *Corytophanes* + *Laemanctus* y *Basiliscus* como el género hermano, siendo *Corytophanes percarinatus* la única especie vivípara dentro del género y la familia (Townsend et al., 2004; Vieira et al., 2005). La viviparidad en *C. percarinatus* podría ser una adaptación a las deficiencias térmicas de las zonas frías con alta elevación y latitud donde habita (McCoy, 1968; Townsend et al., 2004), así como se ha sugerido para algunas especies del género *Sceloporus* (Mathies y Andrews, 1995; Andrews, 2000). La divergencia entre *Corytophanes* + *Laemanctus* y *Basiliscus* se estima que ocurrió hace 61.7 millones de años, quedando el género *Basiliscus* filogenéticamente alejado de *C. percarinatus* (Taylor et al., 2017). Son necesarios más estudios que involucren información sobre características de la historia de vida y particularmente del estadio en la oviposición de la familia Corytophanidae, ello para inferir la evolución de la viviparidad en la familia.

La variación en el estadio embrionario en la oviposición puede estar moldeada por características de historia de vida que promueven ventajas selectivas a las hembras para modificar el momento de la oviposición y, por tanto, del desarrollo embrionario al responder a fluctuaciones ambientales y fisiológicas (Andrews y Mathies, 2000; Rafferty y Reina, 2012). Es importante conocer el estado embrionario en la oviposición de *B. vittatus*, ya que permite completar huecos dentro de su historia natural, además, permite entender mejor si la temperatura de incubación afecta la proporción de sexos (Suárez-Varón, 2017), puesto que nidadas de *B. vittatus* incubadas a 28 °C dieron como resultado 100% de hembras (Suárez-Varón, datos no publicados); mientras que Acosta et al. (2019), descubrieron un nuevo sistema cromosómico XY en la especie. Estos hallazgos podrían indicar que, a pesar de que

B. vittatus es una especie con presencia de cromosomas sexuales, la temperatura de incubación podría estar anulando el sistema cromosómico sesgando las proporciones sexuales como ocurre en *Pogona vitticeps* (Holleley et al., 2015). Entonces, estudiar el estadio en la oviposición permite ver los efectos directos que produce la temperatura sobre el desarrollo embrionario y en el mecanismo de determinación sexual de la especie.

En conclusión, tanto los aspectos morfológicos como los fisiológicos, así como la posible influencia del modo de forrajeo, aparentemente determinan el estadio en la oviposición en aquellas especies donde la retención embrionaria no ha sido favorecida. Adicionalmente, es necesario realizar comparaciones de este estudio con poblaciones de *B. vittatus* que presentan nidadas múltiples, donde se esperarían estadios embrionarios en la oviposición más tempranos. Son necesarios más esfuerzos para conocer esta característica y generar mejores aproximaciones de las variaciones y factores que afectan el estadio embrionario en la oviposición en lagartijas.

Agradecimientos

A la comunidad de La Selva del Marinero por su hospitalidad y asistencia en campo. A Justin L. Rheubert por su ayuda con la traducción del abstract.

Referencias

- Acosta, A., Suárez-Varón, G., Rodríguez-Miranda, L. A., Lira-Noriega, A., Aguilar-Gómez, D., Gutiérrez-Mariscal, M. et al. (2019). Corytophanids replaced the Pleurodont XY system with a new pair of XY chromosomes. *Genome Biology and Evolution*, 11, 2666–2677. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz196>
- Andrews, R. M. (1997). Evolution of viviparity: variation between two sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. *Journal of Zoology (London)*, 243, 579–595. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1997.tb02803.x>
- Andrews, R. M. (2000). Evolution of viviparity in squamate reptiles (*Sceloporus spp.*): a variant of the cold-climate model. *Journal of Zoology*, 250, 243–253. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb01075.x>
- Andrews, R. M. (2002). Low oxygen: a constraint on the evolution of viviparity in reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75, 145–154. <https://doi.org/10.1086/339388>
- Andrews, R. M. (2004). Patterns of embryonic development. En D. C. Deeming (Ed.), *Reptilian incubation environment, evolution and behaviour* (pp. 75–102). Nottingham, UK: Nottingham University Press.
- Andrews, R. M., Brandley, M. C. y Greene, V. W. (2013). Developmental sequences of squamate reptiles are taxon specific. *Evolution and Development*, 15, 326–343. <https://doi.org/10.1111/ede.12042>
- Andrews, R. M., Díaz-Paniagua, C., Marco, A. y Portheault, A. (2008). Developmental arrest during embryonic development of the common chameleon (*Chamaeleo chamaeleon*) in Spain. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81, 336–344. <https://doi.org/10.1086/529449>

- Andrews, R. M. y Mathies, T. (2000). Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. *Bioscience*, 50, 227–238. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0227:NHORDC\]2.3.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0227:NHORDC]2.3.CO;2)
- Andrews, R. M., Pezaro, N., Doody, J. S., Guarino, F. y Green, B. (2017). Oviposition to hatching: Development of *Varanus rosenbergi*. *Journal of Herpetology*, 51, 396–401. <https://doi.org/10.1670/16-124>
- Andrews, R. M. y Rose, B. R. (1994). Evolution of viviparity: constraints on egg retention. *Physiological Zoology*, 67, 1006–1024. <https://doi.org/10.1086/physzool.67.4.30163876>
- Billy, A. (1988). Observations on the embryology of the unisexual lizard *Cnemidophorus uniparens* (Teiidae). *The Zoological Society of London*, 215, 55–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1988.tb04885.x>
- Blanc, F. (1974). Table de développement de *Chamaeleo lateralis* Gray, 1831. *Annales D'Embryologie et de Morphogenese*, 7, 99–115.
- Braña, F., Bea, A. y Arrayago, M. J. (1991). Egg retention in lacertid lizards: relationships with reproductive ecology and the evolution of viviparity. *Herpetologica*, 47, 218–226.
- Calderón-Espinosa, M. L., Andrews, R. M. y Méndez-De la Cruz, F. (2006). Evolution of egg retention in the *Sceloporus spinosus* group: exploring the role of physiological, environmental, and phylogenetic factors. *Herpetological Monographs*, 20, 147–158. [https://doi.org/10.1655/0733-1347\(2007\)20\[147:EOERIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1655/0733-1347(2007)20[147:EOERIT]2.0.CO;2)
- Cooper, W., Castañeda, G., García-De la Peña, C., Wilson, B., Caldwell, J. y Vitt, L. (2013). Foraging modes of some Jamaican, Costa Rican, and Mexican lizards. *Herpetology Notes*, 6, 591–597.

- Cuellar, O. (1984). Reproduction in a parthenogenetic lizard: with a discussion of optimal clutch size and a critique of the clutch weight/body weight ratio. *The American Midland Naturalist*, 111, 242–258. <https://doi.org/10.2307/2425319>
- DeMarco, V. (1993). Estimating egg retention times in sceloporine lizards. *Journal of Herpetology*, 27, 453–458. <https://doi.org/10.2307/1564836>
- Dufaure, J. P. y Hubert, J. (1961). Table de développement du lézard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Archives Anatomie Microscopie Morphologie Expérimental*, 50, 309–328.
- Ewert, M. A. (1985). Embryology of turtles. En C. Gans, F. Billett y P. F. A. Maderson (Eds.), *Biology of the Reptilia, Vol. 14, Development A* (pp. 75–267). New York: John Wiley and Sons.
- Ferguson, M. W. J. (1985). Reproductive biology and embryology of the crocodylians. En C. Gans, F. Billett y P. F. A. Maderson (Eds.), *Biology of the Reptilia, Vol. 14, Development A* (pp. 329–491). New York: John Wiley and Sons.
- García-Collazo, R., Villagrán-Santa Cruz, M., Morales-Guillaumin, E., Meza-Lázaro, R. N. y Méndez-de la Cruz, F. R. (2012). Egg retention and intrauterine embryonic development in *Sceloporus aeneus* (Reptilia: Phrynosomatidae): implications for the evolution of viviparity. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 802–808. <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.33595>
- Granados-González, G., Pérez-Almazán, C., Gómez-Benitez, A., Walker, J. y Hernández-Gallegos, O. (2020). *Aspidoscelis costatus costatus* (Squamata, Teiidae): high elevation clutch production for a population of a whiptail lizards. *Herpetozoa*, 33, 131–137. <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.33.e54901>

- Hernández-Gallegos, O., Pérez-Almazán, C., López-Moreno, A. E., Granados-González, G. y Walker, J. (2011). *Aspidoscelis sacki* (Sack's Spotted Whiptail). Reproduction. *Herpetological Review*, 42, 428.
- Heulin, B., Ghielmi, S., Vogrin, N., Surget-Groba, Y. y Guillaume, C. P. (2002). Variation in eggshell characteristics and in intrauterine egg retention between two oviparous clades of the lizard *Lacerta vivipara*: insight into the oviparity-viviparity continuum in squamates. *Journal of Morphology*, 252, 255–262. <https://doi.org/10.1002/jmor.1103>
- Hirth, H. F. (1963). The ecology of two lizards on a tropical beach. *Ecological Monographs*, 33, 83–112. <https://doi.org/10.2307/1948557>
- Holleley, C., O'Meally, D., Sarre, S., Marshall-Graves, J., Ezaz, T., Matsubara, K. et al. (2015). Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature*, 523, 79–82. <https://doi.org/10.1038/nature14574>
- Hopwood, N. (2007). A history of normal plates, tables and stages in vertebrate embryology. *The International Journal of Developmental Biology*, 51, 1–26. <https://doi.org/10.1387/ijdb.062189nh>
- Ibarra-Manríquez, G. y Sinaca, C. (1987). *Listado florístico de México VII, de la estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas"*. México D.F.: Instituto de Biología, UNAM.
- López-Moreno, A. E. (2011). *Efecto de la temperatura de incubación sobre el fenotipo de Aspidoscelis costata costata (Squamata: Teiidae) (Tesis de maestría)*. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.

- Manríquez-Morán, N. L., Villagrán-Santa Cruz, M. y Méndez-De la Cruz, F. (2005). Reproductive biology of the parthenogenetic lizard, *Aspidoscelis cozumela*. *Herpetologica*, 61, 435–439. <https://doi.org/10.1655/04-41.1>
- Masson, G. R. y Guillette, L. J. Jr. (1987). Changes in oviductal vascularity during the reproductive cycle of three oviparous lizards (*Eumeces obsoletus*, *Sceloporus undulatus* and *Crotaphytus collaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 80, 361–372. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0800361>
- Mathies, T. y Andrews, R. M. (1995). Thermal and reproductive biology of high and low elevation populations of the lizard *Sceloporus scalaris*: implications for the evolution of viviparity. *Oecologia*, 104, 101–111. <https://doi.org/10.1007/BF00365568>
- Mathies, T. y Andrews, R. M. (1996). Extended egg retention and its influence on embryonic development and egg water balance: Implications for the evolution of viviparity. *Physiological Zoology*, 69, 1021–1035. <https://doi.org/10.1086/physzool.69.5.30164244>
- Mathies, T. y Andrews, R. M. (1999). Determinants of embryonic stage at oviposition in the lizard *Urosaurus ornatus*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72, 645–655. <https://doi.org/10.1086/316707>
- McCoy, C. J. (1968). Reproductive cycles and viviparity in Guatemalan *Corytophanes percarinatus* (Reptilia: Iguanidae). *Herpetologica*, 24, 175–178.
- Meza-Lázaro, R. N. (2004). *Reconstrucción de la evolución de la viviparidad en el género Sceloporus: evaluación de los estadios a la oviposición y del grosor del cascarón (Tesis de Licenciatura)*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.

- Moffat, L. A. (1985). Embryonic development and aspects of reproductive biology in the tuatara, *Sphenodon punctatus*. En C. Gans, F. Billett y P. F. A. Maderson (Eds.), *Biology of the Reptilia, Vol. 14, Development A* (pp. 493–521). New York: John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.2307/2409155>
- Packard, M. y DeMarco, V. (1991). Eggshell structure and formation in eggs of oviparous reptiles. En D. C. Deeming y M. Ferguson (Eds.), *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles* (pp. 53–69). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511585739.006>
- Py-Daniel, T. R., Soares-de Lima, A. K., Campos-Lima, F., Pic-Taylor, A., Pires-Junior, O. R. y Sebben, A. (2017). A staging table of post-ovipositional development for the south American collared lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae). *The Anatomical Record*, 300, 277–290. <https://doi.org/10.1002/ar.23500>
- Qualls, C. P., Andrews, R. M. y Mathies, T. (1997). The evolution of viviparity and placentation revisited. *Journal of Theoretical Biology*, 185, 129–135. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0294>
- Rafferty, A. R., Evans, R. G., Scheelings, T. y Reina, R. (2013). Limited oxygen availability in utero may constrain the evolution of live birth in reptiles. *The American Naturalist*, 181, 245–253. <https://doi.org/10.1086/668827>
- Rafferty, A. R. y Reina, R. D. (2012). Arrested embryonic development: a review of strategies to delay hatching in egg-laying reptiles. *Proceedings of the royal society B*, 279, 2299–2308. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0100>
- Rodríguez-Díaz, T. y Braña, F. (2012). Altitudinal variation in egg retention and rates of embryonic development in oviparous *Zootoca vivipara* fits predictions from de

- cold-climate model on the evolution of viviparity. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 1877–1887. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02575.x>
- Shine, R. (1983). Reptilian reproductive modes: the oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica*, 39, 1–8.
- Shine, R. y Bull, J. (1979). The evolution of live-bearing in lizards and snakes. *The American Naturalist*, 113, 905–923. <https://doi.org/10.1086/283444>
- Sinervo, B. y Licht, P. (1991). Proximate constraints on the evolution of egg size, number, and total clutch mass in lizards. *Science*, 252, 1300–1302. <https://doi.org/10.1126/science.252.5010.1300>
- Smith, C., Telemeco, C. R., Angilletta, M. y VandenBrooks, J. M. (2015). Oxygen supply limits the heat tolerance of lizard embryos. *Biology Letters*, 11, 20150113. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0113>
- Suárez-Varón, G. (2015). *Ecología de Basiliscus vittatus (Squamata, Corytophanidae): estructura poblacional y proporción sexual (Tesis de Licenciatura)*. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.
- Suárez-Varón, G. (2017). *Características de la nidada y de las crías de Basiliscus vittatus (Squamata: Corytophanidae) (Tesis de maestría)*. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.
- Suárez-Varón, G., Suárez-Rodríguez, O., Granados-González, G., Villagrán-Santa Cruz, M., Gribbins, K. M., Cortez-Quezada, D. et al. (2019). Relative clutch mass of *Basiliscus vittatus* Wiegmann, 1828 (Squamata, Corytophanidae): female morphological constraints. *Herpetozoa*, 32, 211–219. <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.32.e35910>

- Suárez-Varón, G., Suárez-Rodríguez, O., Gribbins, K. M. y Hernández-Gallegos, O. (2016). *Basiliscus vittatus*. Oviposition site. *Mesoamerican Herpetology*, 3, 1006–1007.
- Taylor, G., Santos, J., Perrault, B., Morando, M., Vásquez-Almazán, C. y Sites, J. (2017). Sexual dimorphism, phenotypic integration, and the evolution of head structure in casque-headed lizards. *Ecology and Evolution*, 7, 8989–8998. <https://doi.org/10.1002/ece3.3356>
- Townsend, J. H., McCranie, J. y Wilson, L. (2004). *Corytophanes percarinatus*. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, 791, 1–3.
- Uetz, P., Freed, P. y Hošek, J. (2021). The Reptile Database. Recuperado el 19 febrero, 2021 de: <http://www.reptile-database.org>.
- Urbina-Cardona, J. N., Olivares-Pérez, M. y Reynoso, V. H. (2006). Herpetofauna diversity and microenvironment correlates across a pasture-edge-interior ecotone in tropical rainforest fragments in the Los Tuxtlas Biosphere Reserve of Veracruz, México. *Biological Conservation*, 132, 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.03.014>
- Vieira, G., Colli, G. y Báó, S. (2005). Phylogenetic relationships of corytophanid lizards (Iguania, Squamata, Reptilia) based on a partitioned and total evidence analyses of sperm morphology, gross morphology, and DNA data. *Zoologica Scripta*, 34, 605–625. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00208.x>
- Vitt, L. J. y Congdon, J. D. (1978). Body shape, reproductive effort and relative clutch mass in lizards: resolution of a paradox. *The American Naturalist*, 112, 595–608.
- Vitt, L. J. y Price, H. J. (1982). Ecological and evolutionary determinants of relative clutch mass in lizards. *Herpetologica*, 38, 237–255.

Woolrich-Piña, G., Smith, G., Lemos-Espinal, J. A., Márquez-Guerra, S., Alvarado-Hernández, A. y García-Montiel, J. (2020). Ecology of *Xenosaurus fractus* (Squamata: Xenosauridae) from Sierra Nororiental, Puebla, México. *Current Herpetology*, 39, 1–12. <https://doi.org/10.5358/hsj.39.1>

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

Capítulo 3

**Determinación y diferenciación sexual de *Basiliscus vittatus* (Squamata:
Corytophanidae)**

Capítulo 3

3.1 Establecimiento del mecanismo de determinación sexual de *Basiliscus vittatus*: Coritofánidos reemplazan el sistema cromosómico XY de los Pleurodontos con un nuevo par de cromosomas XY.

Corytophanids Replaced the Pleurodont XY System with a New Pair of XY Chromosomes

Armando Acosta¹, Gabriel Suárez-Varón², Luis A. Rodríguez-Miranda³, Andrés Lira-Noriega⁴, Diana Aguilar-Gómez¹, Mariana Gutiérrez-Mariscal⁵, Oswaldo Hernández-Gallegos², Fausto Méndez-de-la-Cruz³, and Diego Cortez^{1,*}

¹Center for Genome Sciences, UNAM, Cuernavaca, Mexico

²Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico

³Biology Institute, UNAM, Mexico City, Mexico

⁴CONACYT Research Fellow, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, Xalapa, México

⁵Biotechnology Institute, UNAM, Cuernavaca, Mexico

*Corresponding author: E-mail: dcortez@ccg.unam.mx.

Accepted: September 5, 2019

Data deposition: This project has been deposited at the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under the accession BioProject PRJNA525415. Y-linked sequences from *B. vittatus* have been deposited at the figshare platform: <https://figshare.com/s/9387c059b18c14cf42e4>. The reconstructed transcriptome of *B. vittatus* has been deposited at the figshare platform: <https://figshare.com/s/c45f79ac89e17d648619>. The reconstructed genomes of *B. vittatus* have been deposited at the figshare platform: <https://figshare.com/s/b04db76fb38021ee27ed>. Expression data used in the study is listed in the Supplementary table 2, Supplementary Material online.

Abstract

Almost all lizard families in the pleurodont clade share the same XY system. This system was meticulously studied in *Anolis carolinensis*, where it shows a highly degenerated Y chromosome and a male-specific X chromosome dosage compensation mechanism. Corytophanids (casque-headed lizards) have been proposed as the only family in the pleurodont clade to lack the XY system. In this study, we worked with extensive genomic and transcriptomic data from *Basiliscus vittatus*, a member of the *Corytophanidae* family that inhabits the tropical rainforests of Mexico. We confirmed that *B. vittatus* underwent a sex chromosome system turnover, which consisted in the loss of the pleurodont XY system and the gain of a new pair of XY chromosomes that are orthologous to chicken chromosome 17. We estimated the origin of the sex chromosome system to have occurred ~63 Ma in the ancestor of corytophanids. Moreover, we identified 12 XY gametologues with particular attributes, such as functions related to the membrane and intracellular trafficking, very low expression levels, blood specificity, and incomplete dosage compensation in males.

Key words: casque-headed lizards, *Basiliscus vittatus*, XY chromosomes, sex chromosome system turnovers, sex chromosome evolution.

Introduction

Reptile species have undergone numerous sex determination systems turnovers, with lineages shifting more frequently from environmental-dependent sex determination (ESD) to genotypic sex determination (GSD) (Pennell et al. 2018). The second most-common transition in reptiles is transitions from GSD to ESD (Pennell et al. 2018). In general, very few cases of species shifting from one sex determination system to the same sex determination system, for instance, an XY system to a new XY system, have been documented

(Bachtrog et al. 2014). Reptiles are an ideal taxon to test predictions on the mechanisms of sex determination because ESD and various types of GSD are present in closely related species of the same lineage and sex determination systems can be both of recent origin (<10-Myr old) or very old (> 100-Myr old) (Bachtrog et al. 2014).

For example, in the infraorder *Iguania*, the acrodont clade exhibits a great variety of ESD and GSD systems (Bachtrog et al. 2014), whereas all but one family of lizards in the pleurodont clade share the same sex chromosome system, which

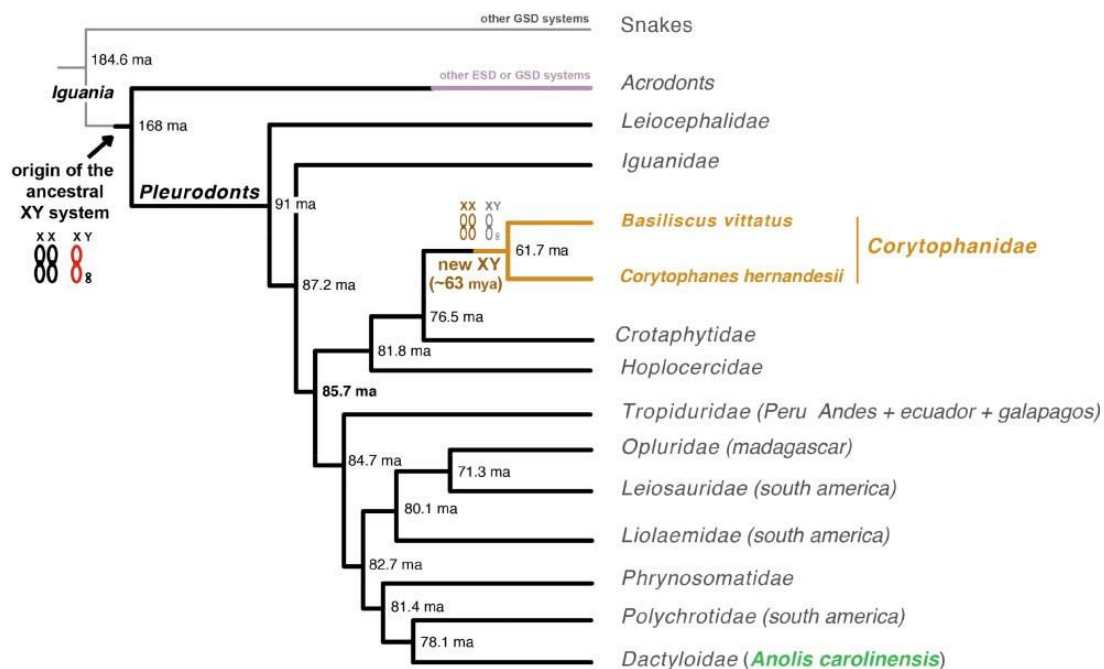


FIG. 1.—Sex determination systems in the pleurodont clade. A tree representing the phylogenetic relationships between the families comprised in the pleurodont clade. The phylogenetic tree was based on Zheng and Wiens (2016). The estimate of *Basiliscus vittatus* and *Corytophanes hernandesii* divergence was taken from Taylor et al. (2017). Millions of years ago are denoted by “Ma.” Black and red XY chromosomes represent the pleurodont sex chromosome system, which originated in the ancestor of the infraorder Iguania. Most families in the pleurodont clade have conserved the same XY chromosomes; data based on Altmanova et al. (2018). This sex chromosome system has been well characterized in the green anole, *Anolis carolinensis* (highlighted in green), where it shows a highly degenerated Y chromosome and a male-specific X chromosome expression level upregulation; data based on Marin et al. (2017). The XY system in the *Corytophanidae* family originated 62.68 Ma (orange and gray XY chromosomes; results from this study). This corytophanid sex chromosome system is composed of heteromorphic sex chromosomes with a degenerated Y chromosome and an incomplete dosage compensation mechanism of the X chromosome in males.

comprises a pair of heteromorphic XY chromosomes (Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova et al. 2018) (fig. 1). These XY chromosomes originated in the ancestor of the infraorder Iguania, 160–170 Ma (Marin et al. 2017) (fig. 1). This sex chromosome system has been studied with great detail in the green anole, *Anolis carolinensis* (*Dactyloidae* family) (Alfoldi et al. 2011; Gamble et al. 2014; Rovatsos, Altmanova, et al. 2014a, 2014b; Kichigin et al. 2016; Marin et al. 2017; Rupp et al. 2017). A previous work identified a highly degenerated Y chromosome in *A. carolinensis* that has conserved only a handful of genes (seven genes) (Marin et al. 2017). Additionally, it was also found that in order to maintain balanced gene expression levels in both sexes and counterweight the massive loss of genetic material of the Y chromosome, the X chromosome in *A. carolinensis* evolved a male-specific mechanism that triggers the hyper-acetylation of the lysine 16 on the histone 3, which in turn mediates the global upregulation of gene expression on the X chromosome (Marin et al. 2017).

In the pleurodont clade, only the species in the *Corytophanidae* family (casque-headed lizards) seem to lack the canonical XY system (Altmanova et al. 2018) (fig. 1). Two previous studies (Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova

et al. 2018) examined four species of corytophanids (*Laemanctus longipes*, *Laemanctus serratus*, *Corytophanes hernandesii*, and *Basiliscus plumifrons*) and quantified the copy number of six genes that are X-linked in *A. carolinensis*. The researchers found that both males and females of corytophanids presented two copies of these genes. These results could indicate that the orthologous chromosome to the X chromosome in the closely related species *A. carolinensis* is an autosome in the corytophanids. However, the copy number of so few genes could also be influenced by X/Y gene conversion or translocations of genetic material between the X and Y chromosomes.

In this study, we used extensive genomic and transcriptomic data from the brown basilisk, *Basiliscus vittatus*, from a population that inhabits the tropical rainforests of Mexico, to confirm the loss of the pleurodont XY system. In addition, we identified and characterized a new XY system in corytophanids, which is based on chromosomes that are orthologous to the chicken chromosome 17. The corytophanid sex chromosomes originated in the ancestor of the family ~62.68 Ma. We also explored the functions, sex determination candidates, expression levels, and evolution of the novel sex chromosome system.

Materials and Methods

Genome Data Generation, Assemblies, and Coverage Analyses

One adult male and one adult female individual of *B. vittatus* species were captured from a population that inhabits an open riverbed juxtapositioned to tropical rainforest habitat at the community of “La Selva del Marinero” in Veracruz, Mexico (170 m.a.s.l.; SEMARNAT Scientific Collector Permit 08-043). Sex was determined based on the size of the crests (larger in males), body size (males are bigger), and body coloration (wider yellow stripes in males). Later, sex was confirmed by the presence of ovaries or testis during the dissections. Both individuals were sacrificed using a lethal dose of pentobarbital; this study met legal regulations and institutional procedures for the investigation of the University of Mexico. Additionally, blood samples for *B. vittatus* ($n = 6$; three males and three females) and *C. hernandesii* ($n = 6$; three males and three females) individuals were obtained. We generated DNA-seq libraries for the male and female of *B. vittatus* from liver tissue using the Illumina TruSeq DNA protocol for short insert size (400–450 nt). The paired-end DNA-seq libraries were sequenced on Illumina HiSeq 2500 sequencers at the Macrogen facility in Korea (100-nt paired-end reads). We sequenced both genomes at approximately 6× of coverage based on the size of the *A. carolinensis* genome (1.7 Gb). The quality of the reads was verified using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>; last accessed September 13, 2019) and the remaining adaptors were removed with Trimmomatic (Bolger et al. 2014). We then followed a methodology previously applied to the analysis of sex chromosomes in snakes (Vicoso et al. 2013). Specifically, the male and female raw genomic reads were assembled into scaffolds using SOAP de novo (v.2; default parameters) (Luo et al. 2012), and the resulting scaffolds were aligned against the six assembled chromosomes and the X-linked scaffolds from the *A. carolinensis* reference genome using BWA (bwa-mem) (Li et al. 2009). The selected scaffolds in the male and female *B. vittatus* genomes were required to align over 50% of their sequence length and above 80% of identity against the *A. carolinensis* genome. We ordered the *B. vittatus* scaffolds following the sequence of the chromosomes and X-linked scaffolds in *A. carolinensis*. We used bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) to align the raw DNA-seq reads from the male and female *B. vittatus* genomes onto the reconstructed chromosomes and X-linked scaffolds of *B. vittatus*. The aligned reads were sorted using SAMtools (Li et al. 2009) and the coverages for each chromosome (including the X chromosome) for males and females were calculated using BEDtools (Quinlan and Hall 2010). To compute the final data illustrated in the figures, we averaged the coverage using windows of 100,000 nucleotides for the 6 main chromosomes and windows of 10,000 nucleotides for the X chromosome. The novel X chromosome in *B. vittatus* was

reconstructed using the sequence of the chicken chromosome 17, because the corresponding scaffolds in the *A. carolinensis* reference genome surpass the 100 fragments. We repeated the same procedure but changed the thresholds for the BWA analysis given that *B. vittatus* diverged before from chicken than from *A. carolinensis*. Selected scaffolds in the *B. vittatus* genomes were required to align over 40% of their sequence length and above 70% of identity against the chicken genome. Genomic data for *A. carolinensis* were taken from Marin et al. (2017).

Transcriptome Data Generation and Assembly of Y-Linked Transcripts

We generated strand-specific RNA-seq libraries (using the Illumina TruSeq Stranded mRNA Library protocol) for a total of 14 samples obtained from blood (twice), brain, heart, liver, kidney, and gonads for both a male and a female of *B. vittatus*. Each library was sequenced on Illumina HiSeq 2500 platforms at the Macrogen facility in Korea (100 nucleotides, paired-end). In order to assemble Y-linked transcripts in *B. vittatus* we used a subtraction approach we applied previously in two studies in mammals/birds (Cortez et al. 2014) and *A. carolinensis* (Marin et al. 2017). We first assessed the quality of the reads from the 14 samples with FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>; last accessed September 13, 2019), trimmed the remaining adaptors with Trimmomatic (Bolger et al. 2014) and removed all reads with ambiguous nucleotides (N). Next, we collapsed all male RNA-seq reads from *B. vittatus* into one single file and aligned these reads onto the de novo reconstructed female genome from *B. vittatus* using Hisat2 (v2.0.2) (Kim et al. 2015); reads not mapping to this genome were selected. We then used all female RNA-seq data from *B. vittatus* to build an index of 35 bp k-mers; following a previous procedure (Akagi et al. 2014). We calculated the frequency of these 35 bp k-mers and removed those showing frequencies below ten; we did not consider rare k-mers as part of the overall signature of the female transcriptome. We used Bowtie2 (2.1.0) (Langmead and Salzberg 2012) to align the more abundant 35 bp k-mers to the male reads that did not align onto the *B. vittatus* female genome (with no mismatches and no indels allowed); we selected the male reads with no successful alignments. Finally, we assembled a male transcriptome with Trinity (v2.0.2, default k-mer of 25 bp) (Grabherr et al. 2011) based on the few selected read that passed all the filters. We obtained putative male-specific transcripts, which were aligned against the raw DNA-seq reads from the male and female *B. vittatus* using BlastN (Altschul et al. 1990). We searched for transcripts having 100% identity over 90% or more of their sequence length in the male genome and no significant alignments in the female genome. Twenty-three transcripts were only found in the male genome. To further reinforce our results, we decided to amplify a subset of six Y-

linked genes using genomic PCRs and DNA from *B. vittatus* blood samples ($n = 6$; three males and three females). The primers used were: *COL1A1* (autosomal/control) forward: TTT CGT GCA GGG TGG GTT CTT T, reverse: TCT GAA CTG GTG CAG CTT CAC A. Whereas Y-linked genes were: *CAMSAP1*, forward: AGT CTC AGT CTG CAC CAG TGA AAG, reverse: TGA TTT CTG AGC CCA GGC AGT T. *GOLGA2*, forward: AGG CTG TCA GTC TCA CTC AGT AAG, reverse: CCC CAT ATT CCC AGG TTC TGT CA. *EHMT1*, forward: TCT CCC AGG GTT ACG AAC GGA T, reverse: TGT CTA CGG AAT TGA CGC AGG GAA. *RAB14*, forward: GTG CCT TTG GCT GCT TCG TTT T reverse: ATG TGC TAG GCC TGC AAT GAG T. *HSPA5*, forward: TGT TTT GGA AGG CAC GCA GCT A, reverse: TCG TCA TCG TCA GCA AAC ACA C. *ZBTB34*, forward: TCC TGC CAA ACA GTG ACC AGA T, reverse: AGC ACC TCA TGG CTG GTT GT. *NIBANY/FAM129BY*, forward: AGC CGG GTC ATC GCC TCC TG, reverse: CTC TCG TCC AGG TGC GCT GAG. *CACNA1BY*, forward: GCA CAG TTG GCA ATG ATC AAG T, reverse: GGT CAA CAA ACA TCC CTC TGG CA. Gene with unknown function, forward: CCG CAA CAG CCC TAT CAG CCA, reverse: ACC TGT TGC AGT ATC CTT CAG CT. *MEGF9Y*, forward: GCC CTC CTC GAC ATG ACA TCC C, reverse: AGC CAG TGA TGA TGA ACC TAC AG. *AKIY*, forward: AGC CAT TCT ACC CCG CTC CAA, reverse: TCG AGA GCC CAA AAC CAC GTC T. These primers were designed to specifically amplify Y sequences; accordingly, PCR reactions with female DNA did not show any amplification. The same PCR procedure was repeated using purified DNA from *C. hernandesii*. 0.2–0.5 ml of blood was extracted from the caudal vein with a 1 ml needle from 3 males and 3 females of *B. vittatus* and *C. hernandesii* ($n = 6$ for each species). Blood was immediately mixed with a buffer containing heparin and conserved at 4 °C. The wound on the animal skin was disinfected and the animals were released 24 h later at the same location where they were captured based on the recorded GPS coordinates. Male/female blood DNA was extracted following the manufacturer's instructions using the Kit Blood DNA Isolation Mini de Norgen Biotek (cat. 46300). PCRs were performed with the Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific; cat. F548S) 30 cycles at 98 °C for 2 s, 66 °C for 5 s, and 72 °C for 10 s. PCR reactions were run on agarose gels (2%). Initially, we did not know whether *B. vittatus* presented XY or ZW chromosomes. So, in parallel, we ran the methodology starting with female RNA-seq data to determine the presence of potential W-linked sequences. All potential W-linked sequences were found in both the male and female genomes and represented false-positive transcripts.

Search for *A. carolinensis* Y-Linked Genes

We applied a previously established genomic approach to search for Y genes using the orthologous genes found in other species (in this case, *A. carolinensis*) on the basis of

high-throughput genomic sequencing data (Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017). We figured that using orthologous sequences of Y and X gametologues, one could identify the orthologous genes from the genomic raw sequencing data in targeted species. Thereby, we used the known Y-linked genes from *A. carolinensis* and searched for their best matching reads (best identity) in the *B. vittatus* male and female raw DNA-seq reads using BlastN (Altschul et al. 1990). We then assembled the best target sequence (higher identity) and compared the resulting sequences against the sequences obtained with the same methodology but using the X gametologues from *A. carolinensis*. In both cases, using either the Y or the X gametologues, we reconstructed the orthologous gene to the *A. carolinensis* X-linked gene. Thus, we ruled out the presence of any *A. carolinensis* Y-linked genes that might have escaped the pleurodont Y chromosome by retrotransposition, transposition, or chromosomal fusion.

Assignment of Y Gene Names

To establish Y gene identity, we searched NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; last accessed September 13, 2019) for the closest homologs using BlastN and BlastX (Altschul et al. 1990). Transcripts without any significant match and without clear open reading frame predictions were considered to be noncoding. We note that the RNA-seq-based Y transcript reconstructions are expected to usually yield the most frequent isoform for a given Y gene. Functions of Y-linked genes were obtained from genecards (<http://www.genecards.org>; last accessed September 13, 2019).

Synonymous Substitution Analyses

To estimate the approximate age at which XY gametologues halted homologous recombination, pairwise alignments of coding sequences of XY gametologues were obtained using PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) based on encoded amino acid sequences. d_s values were then calculated using codeml (pairwise option) as implemented in the PAML package (Yang 1997). Six XY gametologues presented d_s values above 0.2 and five XY gametologues presented values below 0.2 that could represent older and younger gametologues, respectively. An older (stratum 1) and a younger (stratum 2) strata were later confirmed by a PCR approach using genomic DNA from *C. hernandesii* (see main text).

To assess the age at which the novel XY system was originated, we followed a previous procedure (Cortez et al. 2014). Briefly, we used the codeml free-ratio model, as implemented in the PAML package (Yang 1997). For each pair of the six XY gametologues in stratum 1 (see above; table 1) we aligned using PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) the coding sequences of XY genes in *B. vittatus* and the coding sequences from one-to-one orthologous genes in *A. carolinensis*, chicken, the soft-shell Chinese turtle, opossum, mouse,

Table 1
Protein-Coding Y-Linked Genes Identified in *Basiliscus vittatus*

	Gene	Type	d_s	Y gene in <i>Corytophanes hernandesii</i>	Strata	<i>Anolis</i> Chromosome	Chicken Chromosome	Human Chromosome	Function
1	<i>NIBANY/FAM129BY</i>	Protein-coding	0.42	Yes	1	GL343556	17	9	Family with sequence similarity 129 member B
2	<i>CAMSAP1Y</i>	Protein-coding	0.36	Yes	1	GL343625	17	9	Calmodulin regulated spectrin associated protein 1
3	Unknown	Protein-coding	0.27	Yes	1	NA	NA	NA	Hypothetical zinc finger
4	<i>EHMT1Y</i>	Protein-coding	0.26	Yes	1	GL343556	17	9	Euchromatic histone lysine methyltransferase 1
5	<i>CACNA1BY</i>	protein-coding	0.24	Yes	1	GL343556	17	9	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B
6	<i>AKIY</i>	Protein-coding	0.22	No	2	AAWZ02036994	17	9	Adenylate kinase isoenzyme 1
7	<i>MEGF9Y</i>	Protein-coding	0.17	No	2	GL343398	17	9	Multiple EGF like domains 9
8	<i>RAB14Y</i>	Protein-coding	0.11	No	2	AAWZ02036218	17	9	Member RAS oncogene family
9	<i>HSPA5Y</i>	Protein-coding	0.088	No	2	AAWZ02037731	17	9	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5
10	<i>GOLGA2Y</i>	protein-coding	0.083	No	2	GL343763	17	9	Golgin A2
11	<i>ZBTB34Y</i>	Protein-coding	0.069	No	2	GL343502	17	9	Zinc finger and BTB domain containing 34
12	<i>CCDC183Y</i>	Protein-coding	NA	No	2	NA	NA	9	Coiled-coil domain containing 183

human, and *Xenopus*; orthologous coding sequences were downloaded from the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/>; last accessed September 13, 2019; v.92). We concatenated the individual gene alignments and selected random positions from the concatenation to generate a new alignment with the original length; we repeated this operation 100 times (100 bootstrap rounds). For each round, we calculated the synonymous substitutions for all branches of the species tree using codeml (implemented in PAML; Yang 1997). The average branch lengths from the 100 bootstraps were calibrated to produce an ultrametric, time-calibrated tree, using the “chronos” library (from the “ape” package in R). We then retrieved the branch lengths just before and after the split of the XY gametologues and the time since corytophanids diverged from *A. carolinensis* (outgroup species). We calculated the age of the sex chromosomes based on the individual branch lengths that together are equivalent to the time that has passed since the divergence between corytophanids and *A. carolinensis*. 95% confidence intervals for the sex chromosome origin estimate were obtained from

the estimates of the 100 individual replicates. The divergence time between corytophanids and *A. carolinensis* was retrieved from the recent time-calibrated phylogeny for *Squamata* reported in Zheng and Wiens (2016) and the weighted-median of the divergence estimate reported at TimeTree (<http://www.timetree.org/>; last accessed September 13, 2019).

RNA-Seq Read Mapping and Expression Analyses

We concatenated the RNA-seq data from the 12 samples from *B. vittatus* and reconstructed a full transcriptome using Trinity (v2.0.2, default k-mer of 25 bp) (Grabherr et al. 2011). Then, RNA-seq reads were mapped to the reconstructed transcriptome using Kallisto (Bray et al. 2016). We downloaded from the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/>; last accessed September 13, 2019; v.92) the transcriptomes of *A. carolinensis* and chicken. RNA-seq reads reported in a previous study (Marin et al. 2017) were mapped to the Ensembl transcriptomes of *A. carolinensis* and chicken using Kallisto.

Gene expression estimates (transcripts per million or TPM) were calculated by Kallisto (100 bootstraps). For each gene in the *B. vittatus*, *A. carolinensis*, and chicken transcriptomes we selected the transcript with the maximum expression level. Normalization across samples was performed using a previous median scaling procedure (Brawand et al. 2011) that uses one-to-one orthologous genes expressed in all samples to obtain correcting indexes. Comparisons of expression levels between genes on current/ancestral and male/female chromosomes were carried out as previously described (Julien et al. 2012; Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017). Specifically, to infer ancestral expression levels we exploited the fact that current sex chromosomes are derived from ancestral autosomes and, therefore, have autosomal counterparts in species with nonhomologous sex chromosomes, which are informative concerning proto-sex chromosome expression patterns. We calculated ancestral sex chromosome expression levels as median expression levels of autosomal one-to-one orthologues of X genes in outgroup species with different sex chromosomes systems: *A. carolinensis* and chicken. Ancestral inferred expression output values were calculated per one gene copy/allele, that is, the obtained values were divided by 2. The tissue-specificity index (TSI) for a given gene was calculated as the expression level (TPM) in the tissue with the highest expression level divided by the sum of expressions values in all tissues (Julien et al. 2012).

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using the R package, standard libraries. Data were plotted using the R package, “ggplot2” library (<https://ggplot2.tidyverse.org/>; last accessed September 13, 2019).

Results

Corytophanids Lost the XY System Present in All Other Families of Pleurodonts

We sequenced (6× of coverage) and assembled into scaffolds the genomes of one male and one female individuals of *B. vittatus*. The scaffolds were identified and ordered based on their identity to the *A. carolinensis* reference genome (see Materials and Methods), assuming general conservation in gene synteny between the two species. Analyses of the six main autosomes (chromosomes 1–6) resulted in the same genomic read coverage for males and females (fig. 2a, blue and red lines). Importantly, we also observed the same genomic read coverage in both sexes for the orthologous sequences to the X chromosome in *A. carolinensis* (fig. 2a, blue and red lines), hence this chromosome is present in two copies in the male and female genomes of *B. vittatus* and it is indistinguishable from any other autosome. In contrast, in species that harbor heteromorphic XY chromosomes, such as *A. carolinensis*, the X chromosome shows half of the genomic read coverage in males (one X chromosome present; fig. 2a, green line

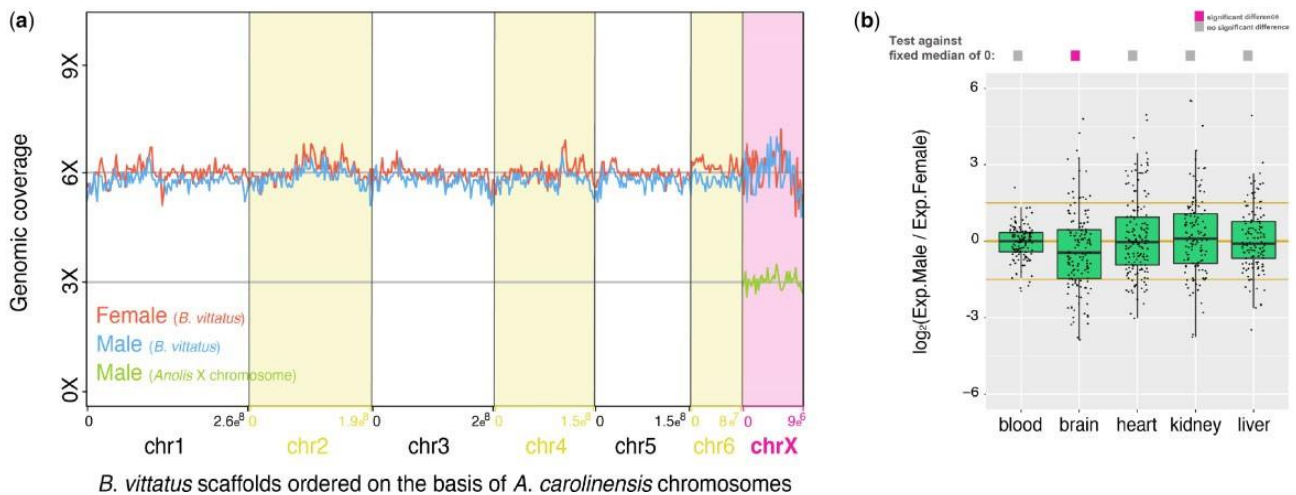


FIG. 2.—Analysis of the pleurodont X chromosome in *Basiliscus vittatus*. (a) Coverage analyses using either male (blue line) or female (red line) genomic reads for the six main autosomes and the pleurodont X chromosome. Autosomes and the pleurodont X chromosome in *B. vittatus* were assembled on the basis of *Anolis carolinensis* reference genome. The expected coverage of an X chromosome in males with heteromorphic XY chromosomes is exemplified by the genomic coverage of the X chromosome in *A. carolinensis* (green line); genomic data for *A. carolinensis* were taken from Marin et al. (2017). (b) Boxplots representing the male/female expression ratio of genes located on the pleurodont X chromosome ($n = 218$ genes) in somatic tissues. Significant differences (Mann–Whitney U test; Benjamini–Hochberg-corrected $P < 0.05$ of temperatures against a distribution with fixed median of 0 (i.e., similar expression levels of X genes in males and females). Gray filled squares denote nonsignificant differences between male/female ratios of X genes against a distribution with fixed median of 0, whereas pink filled squares denote significant differences. Error bars, maximum and minimum values, excluding outliers.

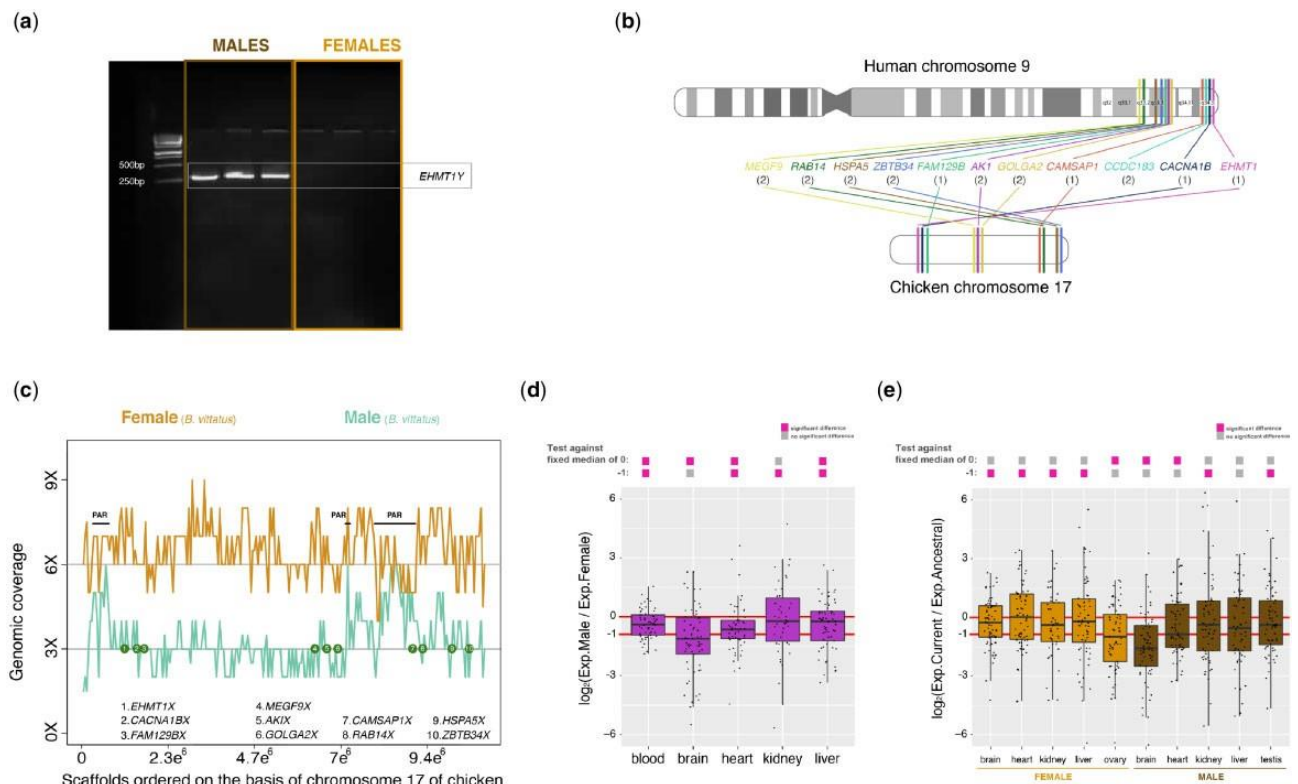


FIG. 3.—Analysis of the novel XY chromosomes. (a) Agarose gel showing the PCR products of the *EHMT1Y* and *COL1A1* genes. The control gene, *COL1A1*, was amplified in both males and females, whereas the exemplified Y-specific gene, *EHMT1Y*, was amplified only in males. (b) Diagram depicting the chromosomal positions in human and in the chicken of the orthologous genes to the XY gametologues in *Basiliscus vittatus*. The numbers correspond to the strata assignments (see Table 1 and main text). (c) Coverage results for the novel X chromosome in *B. vittatus* using either male (green line) or female (orange line) genomic reads. The X chromosome in *B. vittatus* was assembled on the basis of the chicken chromosome 17. Green circles denote the approximate location of the X gametologues; numbers correspond to the genes shown in the figure. (d) Boxplots representing the male/female expression ratios of genes located on the novel X chromosome ($n = 67$ genes) in somatic tissues. Significant differences (Mann–Whitney *U* test): Benjamin–Hochberg-corrected $P < 0.05$ of temperatures against distributions with fixed medians of 0 (i.e., similar expression levels of X genes in males and females) and -1 (i.e., half the expression levels of X genes in males compared with females). (e) Boxplots representing the current/ancestral expression ratio for genes located on the novel X chromosome ($n = 67$ genes) for female tissues (light brown) and male tissues (dark brown). Significant differences (Mann–Whitney *U* test): Benjamin–Hochberg-corrected $P < 0.05$ of temperatures against distributions with fixed medians of 0 (i.e., current and ancestral expression levels are similar) and -1 (i.e., current expression levels are half of the ancestral expression levels). (d–e) Gray filled squares denote nonsignificant differences between male/female ratios of X genes and a distribution with fixed medians (0 or -1), whereas pink filled squares denote significant differences. Depending on the dispersion of the data, a sample could be either not significant or significantly different from the two fixed medians. Error bars, maximum and minimum values, excluding outliers.

line) compared with females (two X chromosomes present). Scaffolds corresponding to the pleurodont X chromosome in *B. vittatus* are described in [supplementary table 1, Supplementary Material](#) online.

Moreover, the old X chromosome in *B. vittatus* exhibited the same expression levels in most somatic tissues in males and in females (except for brain that shows female-bias expression; Benjamin–Hochberg-corrected Mann–Whitney *U* test against a reference value of “0,” $P < 0.05$; fig. 2b), indicating that the old X chromosome shows balanced expression levels between sexes and that the male-specific X upregulation mechanism described in *A. carolinensis* (Marin et al. 2017) is probably lost. Lastly, we searched the male and

female genomes of *B. vittatus* for *A. carolinensis* Y-linked genes that could have either escaped the Y chromosome via retrotransposition or were translocated to a different chromosome. We could not find traces of any known Y-linked genes from *A. carolinensis*, meaning the pleurodont Y chromosome was completely lost from *B. vittatus* lineage.

Corytophanids Acquired a New Pair of XY Chromosomes

We applied a subtraction approach to the male and female transcriptomic data of *B. vittatus*. We used RNA-seq data from brain, heart, liver, kidney, and gonads of one male and one female *B. vittatus*. Briefly, we searched for RNA-seq reads that

were only present in males or females. We then assembled sex-specific transcriptomes and aligned the resulting transcripts to the male and female genomic reads to discard those genes with sex-specific expression that are not truly located on sex chromosomes (see Materials and Methods). Out of 3,185 transcripts with male-biased expression, we found that 23 transcripts were present in the male genome of *B. vittatus* and absent from the female genome of *B. vittatus*. Of these 23 male-specific transcripts, 12 code for proteins (table 1), whereas 11 appear to be long noncoding RNAs (no hits in public databases and with no obvious open reading frames) or transposable elements. We validated six protein-coding Y genes employing genomic PCRs (see Materials and Methods), obtaining PCR amplifications only when male DNA was used (fig. 3a).

We noted that the protein-coding Y genes from *B. vittatus* were not orthologous to genes located on the X chromosome of *A. carolinensis*. Instead, they were orthologous to genes located on various scaffolds in this species with no chromosomal assignment (table 1). Despite the long evolutionary distance, we searched the Y-linked genes of *B. vittatus* in the reference genome of chicken. We found that all of them are located on chromosome 17, which is also orthologous to the final segment of the *q* arm on the human chromosome 9 (*q33–q34*; fig. 3b; table 1).

Detailed examination of the scaffolds in *B. vittatus* that are orthologous to the chromosome 17 in chicken showed that the genomic read coverage in males is half ($3\times$) of the genomic read coverage found in females ($6\times$; fig. 3c). Thus, *B. vittatus* shows a fully differentiated pair of XY chromosomes. Importantly, the X gametologues in *B. vittatus* are located on the nonrecombinant region (i.e., the male-specific region) of the sex chromosome (fig. 3c). Of the 287 protein-coding genes annotated on the chromosome 17 of chicken (https://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Location/Chromosome?r=17; last accessed September 13, 2019), which could serve as a proxy of the ancestral gene content, we recovered 95% of the genes on the X chromosome in *B. vittatus* but only 13 (4.5%) genes on the Y chromosome in *B. vittatus*. Based on these results, we inferred that most of the Y content has been lost. Note that the coverage between males and females is similar ($6\times$ of coverage) in three small segments of the chromosome sequence (fig. 3c; PAR labels). These segments likely represent the pseudoautosomal region, which appears divided into three segments probably due to chromosomal rearrangements that occurred following the divergence of chicken and the corytophanids.

We found that the expression levels of the corytophanid X chromosome are biased toward females in blood, brain, heart, and liver tissues (fig. 3d). Male/female expression level ratios of X-linked genes are different from a distribution with fixed median of 0 (i.e., similar expression levels of X genes in males and females), and are also different from a distribution with fixed median of -1 (i.e., half the expression levels of X

genes in males compared with females). Therefore, the male/female expression level ratios for the X chromosome are placed at an intermediate state. This suggests that the X chromosome in males is neither fully compensated nor shows the absence of dosage compensation. Expression level analyses indicate that most X-linked genes are partially compensated. Data from kidney showed data with larger variance and were not significant against the reference value of zero.

We decided to compare the current expression levels of the genes on the corytophanid X chromosome against the estimated ancestral expression. To infer ancestral expression levels, we exploited the fact that the current sex chromosomes are derived from ancestral autosomes and therefore have autosomal counterparts in species with nonhomologous sex chromosomes, which are informative concerning proto-sex chromosome expression patterns. We estimated ancestral expression levels using one-to-one orthologues of X genes in *A. carolinensis* and chicken. We found that the X chromosome in female tissues maintained the ancestral levels (except for ovary that shows lower current expression levels). In males, the pattern exhibited by the X chromosome seems more complex: brain, heart, and liver show reduced current expression levels, whereas kidney and testis have higher current expression levels.

Functions and Gene Expression Patterns of XY Gametologues in Corytophanids

The gene set found on the Y chromosome of *B. vittatus* is different from those usually described on the Y chromosomes of mammals (Hughes et al. 2010; Bellott et al. 2014, 2017; Cortez et al. 2014; Janecka et al. 2018), the W chromosome of birds (Zhou et al. 2014), or the Y chromosome of *A. carolinensis* (Marin et al. 2017), where many of the few remaining Y and W-linked genes have regulatory functions. In *B. vittatus*, however, only two genes show clear regulatory functions: *EHMT1Y* (transcription regulation) and *ZBTB34Y* (transcription repression). The majority of the Y-linked genes in *B. vittatus* code for proteins with functions associated with the membranes and intracellular trafficking (table 1), such as microtubule-organization (*CAMSAP1Y*), membrane protein (*MEGF9Y*), intracellular membrane trafficking (*RAB14Y*), Golgi-specific protein (*GOLGA2Y*), voltage-dependent calcium channel (*CACNA1BY*), and a member of the axoneme (*CCDC183Y*). Additionally, we found a regulator of phosphorylation (*FAM129BY*), a chaperone (*HSPA5Y*), and an intracellular adenine ratio sensor (*AK1Y*). Associated functions were retrieved from the GeneCards database (<https://www.genecards.org/>; last accessed September 13, 2019).

We also found that X gametologues in both females and males, which are not located in the pseudoautosomal region (fig. 3c), are lowly expressed compared with the ancestral expression levels (minus 1-fold change; fig. 4a). Moreover, with the exception of *ZBTB34Y*, Y-linked genes are very lowly

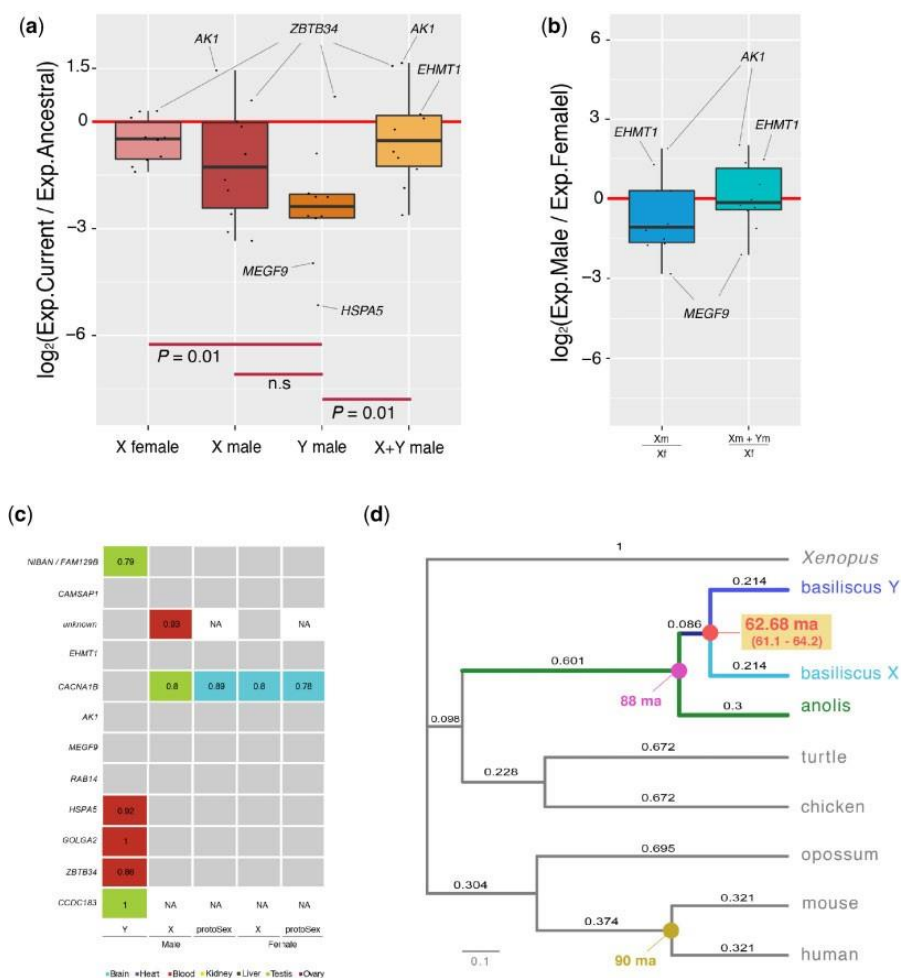


FIG. 4.—Analyses of XY gametologues. (a) Boxplots representing the current/ancestral expression ratio of X gametologues in females, X gametologues in males, Y gametologues in males, and the added expression of X and Y gametologues in males ($n = 10$ genes). Significant differences (Mann-Whitney *U* test). Genes with the highest and lowest expression ratios are indicated. (b) Boxplots representing the expression balance of XY gametologues between the two sexes, that is, the X gametologues expression levels in males compared with those in females, as well as the added expression levels of X and Y gametologues in males compared with the expression levels of the X gametologues in females ($n = 10$ genes). Genes with the highest and lowest expression ratios are indicated. (c) Tissue-specificity index (TSI) of XY gametologues and proto-sex genes (tissue-specificity of orthologous genes in the chicken and the green anole) in males and females. Genes with a tissue-specificity index below 0.7 are colored in gray. Genes with a tissue-specificity index above 0.7 are filled using the colors shown at the bottom of the figure; TSI values are indicated. (d) d_s tree built using the concatenated coding nucleotide sequences of stratum 1 genes and orthologous sequences in other tetrapod species. The age of the sex chromosome system in corytophanids was obtained by comparing specific branch lengths and the age at specific nodes (see Materials and Methods). Age estimates for specific nodes are based on Zheng and Wiens (2016). Millions of years ago are denoted by "Ma."

expressed (minus 2.5-fold change; fig. 4a). However, the added expression of Y and X gametologues in males is similar to the expression of X gametologues in females (fig. 4b), meaning selection has probably acted to maintain a balanced expression level despite the low expression levels of the Y-linked genes.

Interestingly, *EHMT1*-X, a gene that codes for a protein capable of modifying the epigenetic landscape of the genome (<https://www.genecards.org/>; last accessed September 13, 2019), retained the ancestral expression levels in males

when the expression levels of both gametologues were combined (fig. 4a–b). Finally, in corytophanids, following Y expression decay, very few genes changed their tissue-specificity. Most genes were expressed in all tissues at similar levels (fig. 4c). One gene gained testis specificity (*NIBAN/FAM129BY*; fig. 4c), one gene appears to be unique to the Y chromosome and shows testis specificity (*CCDC183Y*; fig. 4c), three genes gained blood specificity (*GOLGA2Y*, *HSPA5Y*, and *ZBTB34Y*; fig. 4c), and one gene gained kidney specificity (*MYO6Y*; fig. 4c).

Origin of the New XY System in Corytophanids

To define the presence of potential strata on the sex chromosomes of *B. vittatus*, we first calculated d_s values between XY gametologues. Six genes showed d_s values greater than 0.2 and could represent older gametologues (table 1). Five genes showed d_s values smaller than 0.2 and could represent younger gametologues (table 1). Finally, one gene, *CCDC183Y* could not be analyzed because the X gene was absent from our database.

The XY chromosomes in *B. vittatus* could be unique of the species or could be present in other species of corytophanids. Previous studies (Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova et al. 2018), however, indicate that several species of corytophanids most likely replaced the pleurodont sex chromosomes by another sex determination system. However, multiple sex determination systems could have evolved in the family. To confirm the presence of the XY system in other corytophanids we sought to amplify by means of genomic PCR the 12 Y-linked protein-coding genes from *B. vittatus* in DNA samples from *C. hernandesii*; this species belongs to the second major clade in the *Corytophanidae* family (fig. 1). The five Y genes with the largest d_s values, *NIBANY/FAM129BY*, *CAMSAP1Y*, the gene with unknown function, *EHMT1Y*, and *CACNA1BY* showed PCR amplification specifically in males (table 1; supplementary fig. 1, Supplementary Material online, for an example), indicating that *C. hernandesii* shares the XY system with *B. vittatus*. According to the fossil record, *B. vittatus* and *C. hernandesii* diverged ~61.7 Ma (fig. 1) (Taylor et al. 2017). Finally, we classified the XY gametologues in two strata: five genes in stratum 1, which halted recombination before the split of *B. vittatus* and *C. hernandesii* (>61.7 Ma) and seven genes in stratum 2 that are probably exclusive of the *B. vittatus* lineage (<61.7 Ma).

Since the split between the *Corytophanidae* and *Crotaphytidae* (sister group) (Zheng and Wiens 2016) families occurred ~76.5 Ma (fig. 1) (Zheng and Wiens 2016), then the sex chromosome system turnover in corytophanids occurred at some point over a period of ~14.8 Myr. In order to obtain a more precise estimate for the origin of the corytophanid XY system, we performed analyses based on d_s trees. We built the trees using the nucleotide sequences of the XY gametologues in *B. vittatus* and orthologous sequences from *A. carolinensis*, chicken, mammals, and *Xenopus*. We compared the branch lengths of the ultrametric, time-calibrated tree, X and Y sequences against the branch length just before their divergence. We calibrated the values based on the divergence time between *A. carolinensis* and *B. vittatus* using the most recent time-calibrated phylogeny of squamates (85.7 Ma; Zheng and Wiens 2016; figs. 1 and 4d; see Materials and Methods). From the concatenated data of stratum 1 gametologues we estimated that the origin of the corytophanid XY system occurred ~61.05 Ma (95% confident intervals:

59.55–63.1 Ma, values derived from 100 bootstrap rounds; fig. 4d).

The age of the sex chromosomes is based on specific branch lengths in the d_s trees and the most recent time-calibrated phylogeny for squamata (Zheng and Wiens 2016). However, alternative phylogenies may affect the inferences we draw from evolutionary processes (Title and Rabosky 2017). We, therefore, repeated the analysis using the time estimate retrieved from the TimeTree database (<http://www.timetree.org/>; last accessed September 13, 2019), which reports the weighted-average divergence estimate from multiple scientific studies. The *A. carolinensis/B. vittatus* split reported in Time Tree is of 88 Ma. We estimated the origin of the XY system to have taken place around 62.68 (61.1–64.2 Ma; 95% confident intervals).

Discussion

In this study, we confirmed that corytophanids lost the pleurodont XY system that, otherwise, has been preserved in all other families of the pleurodont clade (31 species from 12 families of pleurodents have been examined so far) (Gamble et al. 2014; Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova et al. 2018) for 160–170 Myr. Moreover, we showed that corytophanids acquired a new pair of XY chromosomes. The pleurodont Y chromosome was completely lost from corytophanids after the emergence of a new sex-determining gene able to control the signaling cascade that triggers the development of gonads. The pleurodont Y-linked genes were most likely lost because they conserved functional redundancy with the X gametologues and did not evolve significant male-specific functions. This hypothesis could be tested in pleurodents with the ancestral XY system. We also found that the new sex chromosome system in corytophanids has several attributes that are unique compared with other sex chromosomes that have been studied in amniotes. For instance, in mammals, the X gametologues are among the X-linked genes with the highest expression levels (Cortez et al. 2014), and Y-linked genes show regulatory functions that could be beneficial to males, for example, in spermatogenesis. In contrast, Y-linked genes in *B. vittatus* are very lowly expressed, show membrane or intracellular trafficking-related functions and particular tissue-specificity gains, such as blood- and kidney-specific expression. The membrane and transport-related functions of most Y-linked genes are also at odds with the master regulatory role Y chromosomes are supposed to play, a process that is generally driven by genes coding for transcription factors or epigenetic regulators. After screening the Y-linked catalog of *B. vittatus*, the gene *EHMT1Y*, a histone lysine methyltransferase, or the gene *ZBTB34Y*, a transcription repressor, could be promising candidates for sex determination. The *ZBTB34Y* gene, however, is preferentially expressed in blood, which does not fit well with activity during sex determination. The *EHMT1Y* gene shows broad conserved expression across

many somatic tissues, which is also not compatible with a role as a sex-determining regulator. More experiments would be needed to identify the sex-determining gene on either the Y or X chromosomes in corytophanids.

In theory, the X chromosome in females should show twice the expression level compared with males when the Y chromosome has degenerated and there is no dosage compensation mechanism. We propose that males of corytophanids exhibit incomplete dosage compensation, that is, most genes are partially compensated (i.e., relatively lower expression levels in males compared with females). A similar model was proposed for the sex chromosomes in platypus and chicken (Julien et al. 2012).

Gametologues are subjected to specific selection forces because males have maintained an X and Y active alleles that could potentially produce a dosage conflict. In humans, for instance, because one X chromosome is inactivated in females, the X gametologues tend to escape the inactivation process (Bellott et al. 2014) to preserve balanced expression levels between males and females. In *B. vittatus*, XY gametologues show balanced expression levels in both sexes, despite their low expression levels. It has been suggested that Y- and W-linked genes were probably selected due to their haploinsufficiency (i.e., the quantity of proteins produced by one allele is insufficient to carry out the biological function) (Bellott et al. 2014; Cortez et al. 2014). Our results suggest that this hypothesis fits well with the data found in *B. vittatus*.

We classified the XY gametologues in two strata. Stratum 1 is composed of five genes that halted recombination before the split of *B. vittatus* and *C. hernandesii* (>61.7 Ma). Using the synonymous substitution rates of these genes we estimated that the “old-XY system → new-XY system” transition occurred ~62.68 Ma in the ancestor of the *Corytophanidae* family. Note that this estimate could change as new fossils of casqued-head lizards are found (Taylor et al. 2017).

We were unable to identify which environmental or genetic factors could have triggered, ~63 Ma, the sex chromosome system transition in corytophanids. New methods are therefore required to reconstruct the species' ancestral geographical ranges, which could help associate specific sex chromosome system transitions with past environmental fluctuations.

Supplementary Material

Supplementary data are available at *Genome Biology and Evolution* online.

Acknowledgments

This study was supported by grants from PAPIIT-UNAM (RA-200516, RA-200518) and CONACyT-SEP Basic Science grant (254240) awarded to D.C. We thank the people from the community of “La Selva del Marinero” in Veracruz for their

assistance. We also thank the people working at the Massive Sequencing Unity of the University of Mexico (UUSMD-UNAM), particularly Ricardo Grande, Gloria Vázquez, and Alejandro Sánchez. We thank Luis Gamboa for his help.

Authors' Contributions

D.C. designed the study. A.A. and D.C. performed the analyses. O.H.-G. and F.M.-C. organized the fieldwork. A.A., D.C., L.A.R.-M., G.S.-V., D.A.-G., O.H.-G., and F.M.-C. participated in the fieldwork. M.G.-M. manipulated and sacrificed the animals. A.L.-N. performed additional analyses. G.S.-V., L.A.R.-M., O.H.-G., and F.M.-C. contributed to the interpretation of the results with their vast knowledge of the *Corytophanidae* family. D.C., O.H.-G., and F.M.-C. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Literature Cited

- Akagi T, Henry IM, Tao R, Comai L. 2014. Plant genetics. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* 346(6209):646–650.
- Alfoldi J, et al. 2011. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* 477:587–591.
- Altmanova M, et al. 2018. All iguana families with the exception of basilisks share sex chromosomes. *Zoology (Jena)* 126:98–102.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403–410.
- Bachtrog D, et al. 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biol.* 12(7):e1001899.
- Bellott DW, et al. 2014. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 508(7497):494–499.
- Bellott DW, et al. 2017. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nat Genet.* 49(3):387–394.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114–2120.
- Brawand D, et al. 2011. The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature* 478(7369):343–348.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 34(5):525–527.
- Cortez D, et al. 2014. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature* 508(7497):488–493.
- Gamble T, Geneva AJ, Glor RE, Zarkower D. 2014. Anolis sex chromosomes are derived from a single ancestral pair. *Evolution* 68(4):1027–1041.
- Grabherr MG, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7):644–652.
- Hughes JF, et al. 2010. Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* 463(7280):536–539.
- Janecka JE, et al. 2018. Horse Y chromosome assembly displays unique evolutionary features and putative stallion fertility genes. *Nat Commun.* 9(1):2945.
- Julien P, et al. 2012. Mechanisms and evolutionary patterns of mammalian and avian dosage compensation. *PLoS Biol.* 10(5):e1001328.

- Kichigin IG, et al. 2016. Evolutionary dynamics of *Anolis* sex chromosomes revealed by sequencing of flow sorting-derived microchromosome-specific DNA. *Mol Genet Genomics* 291(5):1955–1966.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12(4):357–360.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9(4):357–359.
- Li H et al.; Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16):2078–2079.
- Loytynoja A, Goldman N. 2005. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(30):10557–10562.
- Luo R, et al. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience* 1(1):18.
- Marin R, et al. 2017. Convergent origination of a *Drosophila*-like dosage compensation mechanism in a reptile lineage. *Genome Res*. 27(12):1974–1987.
- Pennell MW, Mank JE, Peichel CL. 2018. Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Mol Ecol*. 27(19):3950.
- Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26(6):841–842.
- Rovatsos M, Altmanova M, Pokorna M, Kratochvil L. 2014a. Conserved sex chromosomes across adaptively radiated *Anolis* lizards. *Evolution* 68(7):2079–2085.
- Rovatsos M, Altmanova M, Pokorna MJ, Kratochvil L. 2014b. Novel X-linked genes revealed by quantitative polymerase chain reaction in the green anole, *Anolis carolinensis*. *G3* (Bethesda) 4:2107–2113.
- Rovatsos M, Pokorna M, Altmanova M, Kratochvil L. 2014. Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas. *Biol Lett*. 10(3):20131093.
- Rupp SM, et al. 2017. Evolution of dosage compensation in *Anolis carolinensis*, a reptile with XX/XY chromosomal sex determination. *Genome Biol Evol*. 9(1):231–240.
- Taylor GW, et al. 2017. Sexual dimorphism, phenotypic integration, and the evolution of head structure in casque-headed lizards. *Ecol Evol*. 7(21):8989–8998.
- Title PO, Rabosky DL. 2017. Do macrophylogenies yield stable macroevolutionary inferences? An example from squamate reptiles. *Syst Biol*. 66(5):843–856.
- Vicoso B, Emerson JJ, Zektser Y, Mahajan S, Bachtrog D. 2013. Comparative sex chromosome genomics in snakes: differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. *PLoS Biol*. 11(8):e1001643.
- Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci*. 13:555–556.
- Zheng Y, Wiens JJ. 2016. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Mol Phylogenet Evol*. 94:537–547.
- Zhou Q, et al. 2014. Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa. *Science* 346(6215):1246338.

Associate editor: Judith Mank

Capítulo 3

3.2 Efecto de la temperatura de incubación en el mecanismo de determinación y diferenciación sexual de *Basiliscus vittatus*.

Introducción

Origen y evolución de los mecanismos de determinación sexual

En amniotas, la determinación sexual es, por un lado, un mecanismo que regula la cascada de procesos genéticos y hormonales que directamente direccionan el sexo gonadal, el cual inicia desde estadios tempranos del desarrollo embrionario y es también donde ocurre la diferenciación gonadal hacia testículos u ovarios (Nelson et al., 2010); y por otra parte, la diferenciación sexual, un proceso que incluye específicamente el desarrollo de testículos y ovarios desde que las gónadas son indiferenciadas o bipotenciales (Hayes, 1998; Nelson et al., 2010). Entonces, determinación sexual y diferenciación sexual son dos procesos distintos, pero estrechamente relacionados.

Los factores que determinan el sexo de un individuo han sido debatidos por más de 3,000 años debido a que la evolución del desarrollo sexual es lábil, particularmente en Sauropsida no aves al presentar múltiples transiciones en sus estrategias reproductoras a lo largo de su filogenia (Rovatsos et al., 2016).

Para rastrear la evolución de los sistemas de determinación del sexo, primero es esencial comprender cómo se relacionan los grupos de vertebrados (Graves, 2008). En este aspecto, los Sauropsida y los mamíferos se estiman divergieron hace 310 millones de años (Modi y Crews, 2005; Pokorna et al., 2011). Las relaciones filogenéticas sugeridas para estos taxa han generado gran discusión sobre el origen evolutivo de las diversas estrategias de determinación sexual y sus transiciones entre los grupos, ya que el enfoque histórico ha considerado a

la determinación sexual dependiente de la temperatura (DST) como el estado ancestral, mientras la determinación sexual genética (DSG) es evolutivamente derivada entre los taxa más recientes (Shine et al., 2002; Pokorná y Kratochvíl, 2009). Por ejemplo, Ezaz et al. (2005) demostraron que los cromosomas sexuales de aves, tortugas y serpientes derivaron de diferentes autosomas de un mismo ancestro común. Se ha sugerido, sin embargo, la posibilidad que la transición haya sido en la dirección opuesta; es decir, de DSG a DST. Esta última hipótesis es vista como una adaptación hacia un ambiente heterogéneo donde las condiciones conferirían mayor adecuación a individuos de un sexo en particular. No obstante, esta transición requiere la desaparición de los cromosomas sexuales del genoma completo (Pokorna y Kratochvil, 2009; Pokorna et al., 2011), un aspecto que sin duda requiere de estudios más complejos que respalden la degeneración de los cromosomas sexuales (Rovatsos et al., 2016). La dirección de la transición se puede evaluar a través de análisis filogenéticos comparativos dentro de un grupo diverso que muestra diferentes mecanismos de determinación del sexo como lo son los Sauropsida no aves (Janzen y Phillips, 2006).

El patrón general de las transiciones evolutivas entre DSG y DST en Sauropsida no aves aún no es claro. Por un lado, los análisis filogenéticos sugieren que DST es un rasgo ancestral en tortugas y cocodrilos (Rice, 1996; Rovatsos et al., 2016) ya que casi todas las especies existentes tienen este modo de determinación sexual (Modi y Crews, 2005). La única especie de Rhynchocephalia muestra DST (Nelson et al., 2010) y, por el contrario, todas las serpientes presentan DSG

y cromosomas sexuales heteromórficos con ambos sistemas cromosómicos, XY y ZW (Gamble et al., 2017; Nielsen et al., 2018). En cuanto a lagartijas, han sido organismos controversiales que merecen un estudio más detallado ya que la DSG y DST pueden coexistir en la misma población (Sarre et al., 2004; Rhen y Schroeder, 2010).

Por ejemplo, en el *Gekko japonicus* a pesar de mostrar cromosomas sexuales heteromórficos, también presenta un patrón de DST bien establecido. Esta co-ocurrencia podría sugerir una fuerte plasticidad fenotípica en los mecanismos de determinación sexual (Viets et al., 1994). Aun así, muchas familias de escamados no tienen especies caracterizadas con un mecanismo de determinación sexual bien establecido, por ejemplo: Anguidae, Cordylidae, Corytophanidae y Gerrhosauridae (Nielsen et al., 2018), lo cual limita los modelos evolutivos sobre el origen de la determinación sexual.

Dentro la familia Corytophanidae, hasta donde sabemos, *Basiliscus plumifrons* es el único miembro que ha sido estudiado en experimentos de incubación térmica. Se piensa que esta especie posiblemente pueda tener DSG al no observarse un patrón de DST. Sin embargo, por los pequeños tamaños de muestra que se usaron, DSG aún no ha podido ser establecida con claridad (Viets et al., 1994). Tal vez, estudios con técnicas citogenéticas actuales podrían revelar la posible presencia de cromosomas sexuales. Por ejemplo, recientemente estudios señalan que *B. vittatus* perdió el sistema de determinación sexual ancestral (XY) común a todo el infra-orden Iguania, por un

mecanismo más reciente que aún no había sido caracterizado (Acosta, Suárez-Varón et al., 2019). En contraste, Suárez-Varón (2017) experimentó con nidadas de *B. vittatus* incubadas a una temperatura de 28°C donde se observó una proporción sexual de los neonatos de 100% hembras. Este resultado sugiere la posible influencia de DST en la determinación del sexo en *B. vittatus*. Por lo anterior, se discute la posible presencia de micro-cromosomas sexuales en *B. vittatus* como un sistema *de novo* de determinación sexual XY y la influencia de la temperatura de incubación en el mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus* (Acosta, Suárez-Varón et al., 2019).

Mecanismos de determinación sexual: los extremos de un continuo

Los mecanismos de determinación sexual DSG y DST por mucho tiempo se consideraron mutuamente excluyentes; es decir, el sexo de un organismo con presencia de cromosomas sexuales no podía estar bajo la influencia de la temperatura de incubación al mismo tiempo. Ahora, estos mecanismos han sido hipotetizados como los extremos de un continuo en el proceso de la determinación sexual (Pokorna y Kratochvil, 2009). Por ejemplo, Shine et al. (2002) encontraron al experimentar con huevos de *Bassiana duperreyi* (una especie con cromosomas heteromórficos XX/XY, hembras/machos) que al incubarlos a <20°C el efecto térmico anuló el mecanismo cromosómico direccionando la DSG a DST y produciendo una proporción sexual sesgada a machos. A su vez Radder et al. (2008) en *B. duperreyi* y Quinn et al. (2007) para *P. vitticeps* (ZZ/ZW) muestran amplia evidencia que, en ambos casos, existe la

presencia de individuos con reversión sexual; un fenómeno que se presenta durante el proceso de desarrollo embrionario en un momento tal que el sexo predispuesto genéticamente (DSG) por la influencia de factores ambientales (presumiblemente temperatura) es redirigido a desarrollar el sexo opuesto (Ezaz et al., 2005; Holleley et al., 2015). Estudios recientes centran la clave para detectar este tipo de organismos a través de conocer su sistema cromosómico por medio de genes maestros que desencadenan cambios en la expresión o la regulación de otros genes en una cadena de señalización, y a pesar de estas mutaciones no se compromete el desempeño sexual de los organismos pudiendo incluso tener descendencia (Devenson et al., 2107).

A partir del descubrimiento en mamíferos del gen *SRY* (sex-determining region Y), el gen maestro en la determinación del sexo, se encontró que su expresión en estadios de desarrollo temprano inicia la diferenciación hacia testículos, mientras su ausencia conduce al desarrollo de ovarios (Bachtrog et al., 2014). En Sauropsida no aves se conocen ahora otros dos genes clave en la determinación del sexo, *DMRT1* y *SOX9*. En varias especies con DST, estos genes se expresan a niveles más altos en las gónadas de organismos que fueron incubados a temperaturas que producen machos en comparación con aquellas temperaturas que determinan hembras (Rhen et al., 2010). La expresión de *DMRT1* y *SOX9* resulta en el desarrollo de testículos en Saurópsidos (Sarre et al., 2004), *DMRT1* se piensa que es el gen determinante sexual de aves y *SOX9* es el blanco de *SRY* en mamíferos. Sin embargo, con el descubrimiento de lacertilios con reversión sexual, un fenómeno poco estudiado debido a su

complejidad y su baja frecuencia, nuevos genes maestros han sido estudiados y ahora estos organismos son distinguibles transcripcionalmente desde la comparación cromosómica de machos y hembras a través de técnicas que cuantifican la retención de intrones en el mRNA de dos genes de la familia Jumonji (JARID2 y JMJD3) (Devenson et al., 2017).

Tal vez el ejemplo más claro de reversión sexual en escamados sea *P. vitticeps*, una lagartija con un sistema de micro cromosomas sexuales ZW/ZZ, (hembras/machos) (Quinn et al., 2007) cuyas temperaturas de incubación mayores de 32°C anulan el sistema cromosómico de los machos (ZZ) para producir hembras, sesgando así la proporción a hembras. Es decir, estos organismos son fenotípicamente hembras, pero genéticamente ZZ (machos para este sistema) resultado de la reversión sexual (machos feminizados) (Quinn et al., 2007; Devenson et al., 2017). Con ello, es notable que la reversión sexual puede desencadenar rápidamente la pérdida del cromosoma sexual heterogamético en estos organismos y por lo tanto promover un cambio del sistema de DSG a DST en una sola generación (Devenson et al., 2017). Con estas múltiples interacciones de factores genéticos y térmicos, los organismos que comparten características de ambos mecanismos pueden resultar en un proceso de transición evolutiva entre los extremos de estos mecanismos.

Justificación

Los mecanismos de determinación sexual para la mayoría de las especies de Sauropsida no aves son desconocidos, ya que sólo se ha documentado para menos del 5% de las especies existentes (Pokorná y Kratochvíl, 2009; Warner, 2011). Esta ausencia de información ha limitado la comprensión de la evolución de los sistemas de determinación sexual aun cuando en este grupo los mecanismos han surgido en múltiples ocasiones. Esto ofrece un interesante modelo para comprender la interacción de factores ambientales (principalmente la temperatura), la proporción sexual y la respuesta de los organismos al cambio climático (su plasticidad fenotípica). Estudios que caracterizan el mecanismo de determinación sexual para especies de manera individual son de gran importancia para llenar los espacios existentes en el entendimiento de la evolución de dichos mecanismos.

Adicionalmente, *B. vittatus* es una especie cuyo mecanismo de determinación sexual no está claramente establecido, ya que dentro de la familia Corytophanidae se ha sugerido DSG (e. g. *B. plumifrons*) a partir de pequeños tamaños de muestra e insuficientes tratamientos térmicos (Viets et al., 1994). Sin embargo, recientemente se ha experimentado con nidadas de *B. vittatus* las cuales dieron 100% de hembras a 28°C a temperatura constante (Suárez-Varón, 2017). Mientras Acosta, Suárez-Varón et al. (2019) describen recientemente para la especie, la presencia de cromosomas sexuales XY de *novo* y distintos al resto de los Pleurodontos. Con ello, se infiere que dentro la familia Corytophanidae, *B. vittatus* puede presentar DST o DSG y probablemente

también sea el caso similar en varias de las especies que conforman este grupo. De esta manera, la familia podría presentar la coexistencia de ambos mecanismos de determinación sexual (DSG/DST). Por ejemplo, un sistema análogo al observado en *B. duperreyi* (una especie con DSG) donde al incubar sus huevos a temperaturas moderadas, la eclosión resulta en una proporción sexual 1:1. Sin embargo, al incubarlos a temperaturas menores a los 15°C la proporción sexual se sesga hacia los machos (Shine et al., 2002). De manera similar este fenómeno se observó en *P. vitticeps*, donde mediante marcadores sexuales de ADN, se demostró que la temperatura anula el sistema de DSG y como consecuencia se producen hembras (Quinn et al., 2007).

Particularmente, en Sauropsida no aves con DST se ha documentado la presencia de cromosomas sexuales crípticos también llamados micro-cromosomas sexuales. Dichos micro-cromosomas han sido vistos como no funcionales, a menudo omitidos de los cariotipos, razón por lo cual los Sauropsida no aves merecen tener un examen más detallado, con técnicas nuevas y más sensibles, que permita establecer el o los mecanismos de determinación sexual (Ezaz et al., 2005). Realizar estudios como el presente, puede dar una visión ecológico-evolutiva hacia las causas que influyen la transición de DSG a DST y viceversa.

Materiales y métodos

Los detalles de la colecta en campo y mantenimiento en cautiverio de las hembras de *B. vittatus* hasta el proceso de oviposición se describen en el capítulo 2 de esta tesis.

Diseño experimental: primera fase

- **Protocolo experimental: estadios embrionarios y días post oviposición**

De cada una de las nidadas de reciente oviposición, se tomó un huevo al azar y se utilizó la tabla de desarrollo embrionario propuesta por Dufaure y Hubert, (1961) para poder determinar el estadio de desarrollo embrionario a la oviposición (para más detalles ver el capítulo 2). Este estadio embrionario fue usado como control (EO), mientras el resto de los huevos fueron marcados con un código de identificación y colocados de manera aleatoria (para evitar el efecto materno), dentro de los tratamientos de incubación térmica que consistieron en la exposición constante a 26, 29 y 32°C en 3 incubadoras Percival L-30®. Todas las incubadoras se mantuvieron dentro $\pm 0.5^\circ\text{C}$ de su temperatura programada durante el experimento (Fig. 1). La fecha del inicio experimental se registró cuando los huevos fueron colocados dentro de las incubadoras.

Los huevos fueron incubados durante algunos días y fueron disecados en diferentes momentos de la incubación con la finalidad de conocer el efecto térmico inducido sobre el desarrollo embrionario y estimar los días que transcurren para que el embrión cambie de un estadio embrionario al estadio

subsecuente. Para ello, se determinó el estadio embrionario post oviposición (EPO) utilizando también los criterios morfológicos propuestos por Dufaure y Hubert, (1961) y se estimaron los días de permanencia que pasan los embriones entre cada estadio de desarrollo:

$$\text{Días de permanencia} = \frac{EPO - EO}{\text{Días de incubación}}$$

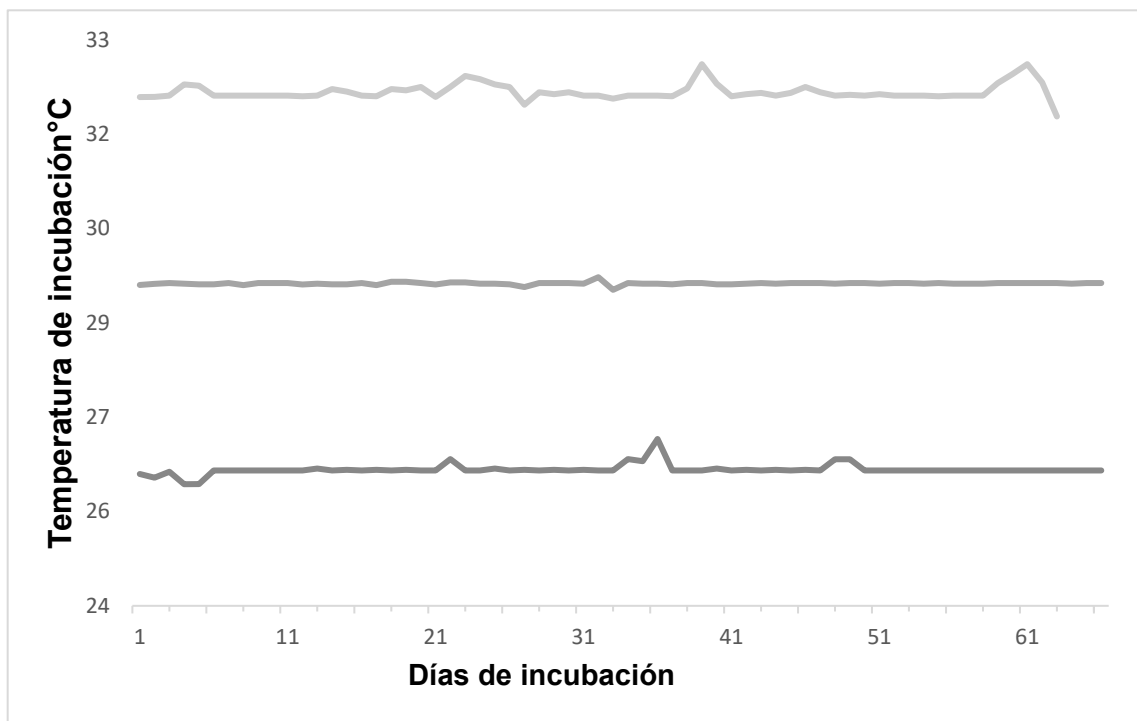


Figura 1. Gráfica que muestra la temperatura de incubación (26, 29 y 32°C ± 0.5) programada durante todo el experimento.

Diseño experimental: segunda fase

- **Experimento térmico: fenotipo y genotipo**

Habiendo estimado en el experimento piloto los días que un embrión permanece entre diferentes estadios embrionarios de acuerdo con el tratamiento térmico al que fueron expuestos, se recolectaron nuevas nidadas de *B. vittatus* y se sometieron a un experimento de incubación con las mismas condiciones térmicas (26, 29 y 32°C). De manera similar, se utilizó un huevo seleccionado al azar para estimar el estadio a la oviposición como punto de referencia del efecto térmico (ver capítulo 2) y por tanto del inicio del experimento; mientras el resto de los huevos fueron incluidos dentro de los diferentes tratamientos térmicos.

Durante el experimento, el proceso de incubación fue detenido cuando los embriones alcanzaron los estadios embrionarios entre el 35 y el 37 (a partir de los días de permanencia en cada estadio embrionario estimados de la primera fase experimental). Se escogieron estos estadios de desarrollo porque las gónadas de los embriones deberían de encontrarse en las etapas iniciales de la diferenciación hacia ovario o testículo como ha sido registrado en otras lagartijas (Antonio-Rubio et al., 2015). Esto permitiría distinguir, a nivel histológico, la estructura celular entre hembras y machos. De esta forma, los huevos fueron disecados y, para corroborar que los estadios embrionarios se encontraban en el intervalo esperado, se observó la estructura morfológica del embrión bajo el microscopio y dicha estructura observada fue comparada con los criterios propuestos de Dufaure y Hubert (1961). Posterior al establecimiento del estadio embrionario, se separó el vitelo del embrión; este último fue sacrificado por

decapitación y por una parte, la cabeza fue almacenada en RNAlater® para su consecuente análisis genético, mientras que el resto del cuerpo fue fijado en solución de Bouin por 30 minutos y después de este tiempo lavado en agua corriente con la finalidad de quitar el exceso de fijador para posteriormente ser almacenados en formaldehído al 10% hasta su procesamiento. Esto se hizo con el objetivo de conocer si la temperatura de incubación tiene un efecto en el fenotipo, en el genotipo y/o sobre la determinación y la diferenciación sexual.

Evaluación del Fenotipo

- **Análisis de Histología**

En primera instancia, los embriones que fueron fijados con anterioridad se procesaron con la técnica histológica convencional y se realizaron cortes histológicos. Para ello, los embriones se seccionaron transversalmente por debajo de las extremidades anteriores para asegurarnos de observar el complejo urogenital (mesonefros/gónadas). Cada muestra se deshidrató en alcoholes de gradación a partir del 30% hasta llegar a alcohol absoluto. Para el proceso de aclaramiento se utilizó xilol, para finalmente incluir las muestras en Paraplast®. Los cortes histológicos se realizaron a 5 micras y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para facilitar la descripción de la estructura gonadal con la finalidad de estimar el estadio donde inicia la diferenciación gonadal y si la temperatura de incubación tiene un efecto sobre la diferenciación gonadal de *B. vittatus*.

Evaluación del Genotipo

La cabeza de cada embrión fue colocada en tubos Eppendorf con RNAlater ® y almacenadas a -80°C. De este tejido, se realizaron PCRs genómicas de dos genes que están en el cromosoma Y de *B. vittatus* (Acosta, Suárez-Varón et al., 2019). Para ello, los primers que se utilizaron en las PCRs fueron diseñados por Acosta, Suárez-Varón et al. (2019), para el gen (autosoma/control): *COL1A1*, forward: TTT CGT GCA GGG TGG GTT CTT T, reverse: TCT GAA CTG GTG CAG CTT CAC A. Mientras el gen *CAMSAP1* (presente solo en machos) forward: AGT CTC AGT CTG CAC CAG TGA AAG, reverse: TGA TTT CTG AGC CCA GGC AGT T. Posteriormente, se utilizó la enzima High Fidelity Polymerase con la siguiente programación en el termociclador:

Paso	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	120s	1
Desnaturalización	95°C	20s	30
Alineación	66.5°C	30s	
Extensión	68°C	60s	
Extensión Final	68°C	60s	1
	4°C ∞		

Análisis de datos

A todas las variables se les verificaron los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, alfa = 0.05) y homocedasticidad de varianzas (Levene's test), y se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas de acuerdo con los supuestos de cada análisis estadístico. Se realizó un ANDEVA con las temperaturas experimentales como factor y los días de cambio entre estadio embrionario como variable dependiente, para conocer si las temperaturas experimentales mostraron un efecto en el proceso de incubación. Adicionalmente, para determinar si la temperatura de incubación influye en la diferenciación gonadal en diferentes estadios embrionarios, se realizó un análisis histológico que permitió describir la morfogénesis gonadal (objetivo específico 2). El fenotipo se basó en los resultados del análisis histológico.

Por otra parte, para determinar si el mecanismo de determinación sexual es dependiente de la temperatura, se consideró el resultado de la proporción sexual fenotípica del gradiente térmico de incubación a través de pruebas de chi cuadrada. Mientras el genotipo se estableció a través de PCRs que identificaron la presencia o ausencia del gen *CAMSAP1* presente en el cromosoma Y. De igual manera, con estos resultados se utilizaron pruebas de chi cuadrada para evaluar la proporción sexual genotípica (objetivo específico 3). Ambas proporciones, fenotípica y genotípica fueron contrastados con la finalidad de evaluar la existencia de reversión sexual y para establecer el mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus*. Todos los análisis fueron realizados con un alfa de 0.05 en el software SPSS®.

Resultados

Fueron colectadas 22 hembras grávidas de *B. vittatus* con los siguientes datos morfométricos, promedio \pm error estándar: LHC = 128.1 mm \pm 1.4, DIA 59.7 mm \pm 0.84 y peso 59.6 g \pm 2.3. De las nidadas provenientes de estas hembras, se obtuvieron 152 huevos, de los cuales 22 (14.4%) fueron disectados a la oviposición (capítulo 2), mientras que del resto de los huevos que fueron incubados dentro los tres tratamientos térmicos resultaron: 42 huevos (27.6%), no funcionales (huevos descartados por presencia de bacterias u hongos); por lo que una muestra final de 88 huevos (57.9%) fueron incubados a 32°C (n= 33), 29°C (n= 29) y 26°C (n= 26).

Experimento térmico de incubación: días entre estadio embrionario.

Los datos obtenidos de este estudio consideran los huevos de *B. vittatus* que fueron incubados en ambas fases experimentales en los diferentes tratamientos térmicos. El gradiente térmico de incubación reveló que cada cambio de estadio embrionario a 32°C ocurre en promedio = 3.3 días \pm 0.09, mientras a 29°C = 4.1 \pm 0.15 días y para 26°C = 5.2 días \pm 0.16. Cuando se compararon los días que pasan los embriones entre cada cambio de estadio embrionario respecto a los tratamientos térmicos de incubación, el ANDEVA arrojó diferencias significativas ($F = 49.84$, $P = 0.0001$, Fig. 2).

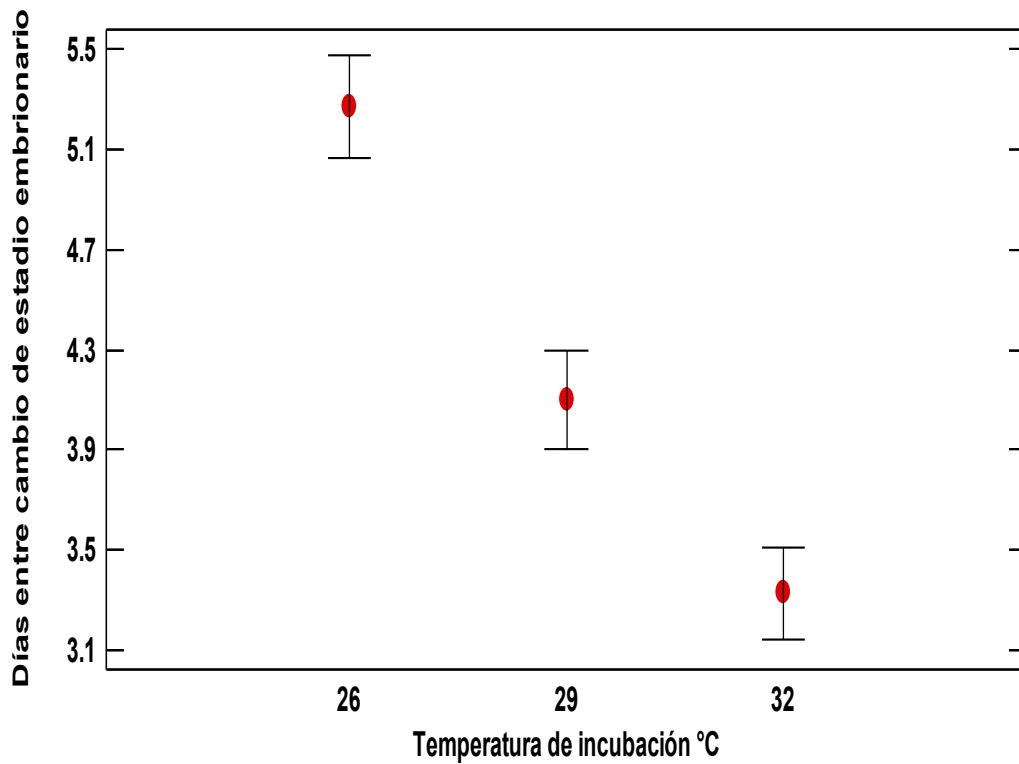


Figura 2. Análisis de varianza donde se observa el efecto de la temperatura de incubación respecto a los días que transcurren para que un embrión de *B. vittatus* cambie de un estadio de desarrollo embrionario a otro en condiciones experimentales.

Fenotipo: Morfogénesis gonadal.

Se analizaron un total de 48 embriones para establecer la diferenciación gonadal de acuerdo con el estadio de desarrollo embrionario. Los cortes histológicos se realizaron de manera transversal sobre la región media posterior del cuerpo ya que las gónadas se encuentran a ambos lados del mesenterio dorsal, situados sobre la superficie ventromedial de los mesonefros (Fig. 3). La estructura gonadal se encuentra revestida por un epitelio cúbico simple, la cual genera una reserva de células para que la gónada continúe su diferenciación y crecimiento.

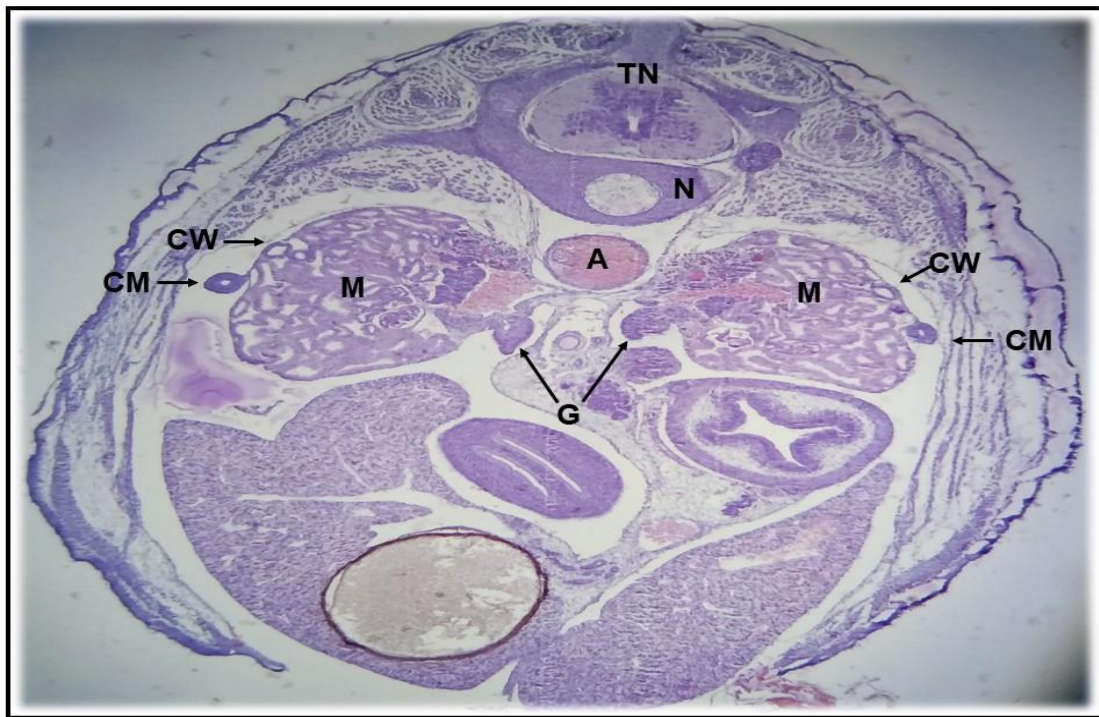


Figura 3. Corte transversal de la región media posterior de un embrión en estadio 36 de *Basiliscus vittatus*. Observe las gónadas que se encuentran a ambos lados del mesenterio dorsal que sostiene el tubo digestivo. TN: tubo neural; N: notocorda; A: aorta; CM: conducto de Müller; CW: conducto de Wolff; G: gónadas; M: mesonefros.

Diferenciación de las gónadas de hembras y machos

- **Estadio 35**

La gónada femenina presenta una morfología ovalada con dos zonas diferenciadas: (1) la corteza, donde se nota el engrosamiento de esta zona estructurada por células epiteliales y células germinales. En esta región se pueden observar células somáticas que darán origen a futuras células foliculares y es notoria la presencia de algunas ovogonias; y (2) la zona medular, la cual se encuentra estructurada en su mayoría por tejido mesenquimatoso, células epiteliales y algunas germinales que van migrando hacia la corteza ovárica. La región medular comienza su degeneración formando un tejido laxo de tejido conjuntivo la cual separa la zona de medular de la corteza (Fig. 4A y B). Por su parte, en este estadio de desarrollo embrionario en el testículo se observan en la región medular los cordones testiculares estructurados de células de origen epitelial periféricas, las futuras células de Sertoli y espermatogonias ubicadas hacia la región interna de los cordones. Llama la atención notar que en algunos cordones testiculares puede observarse un pequeño lumen (Fig. 4C y D). El epitelio que delimita al testículo en diferenciación, está compuesto por células cúbicas bajas o escamosas.

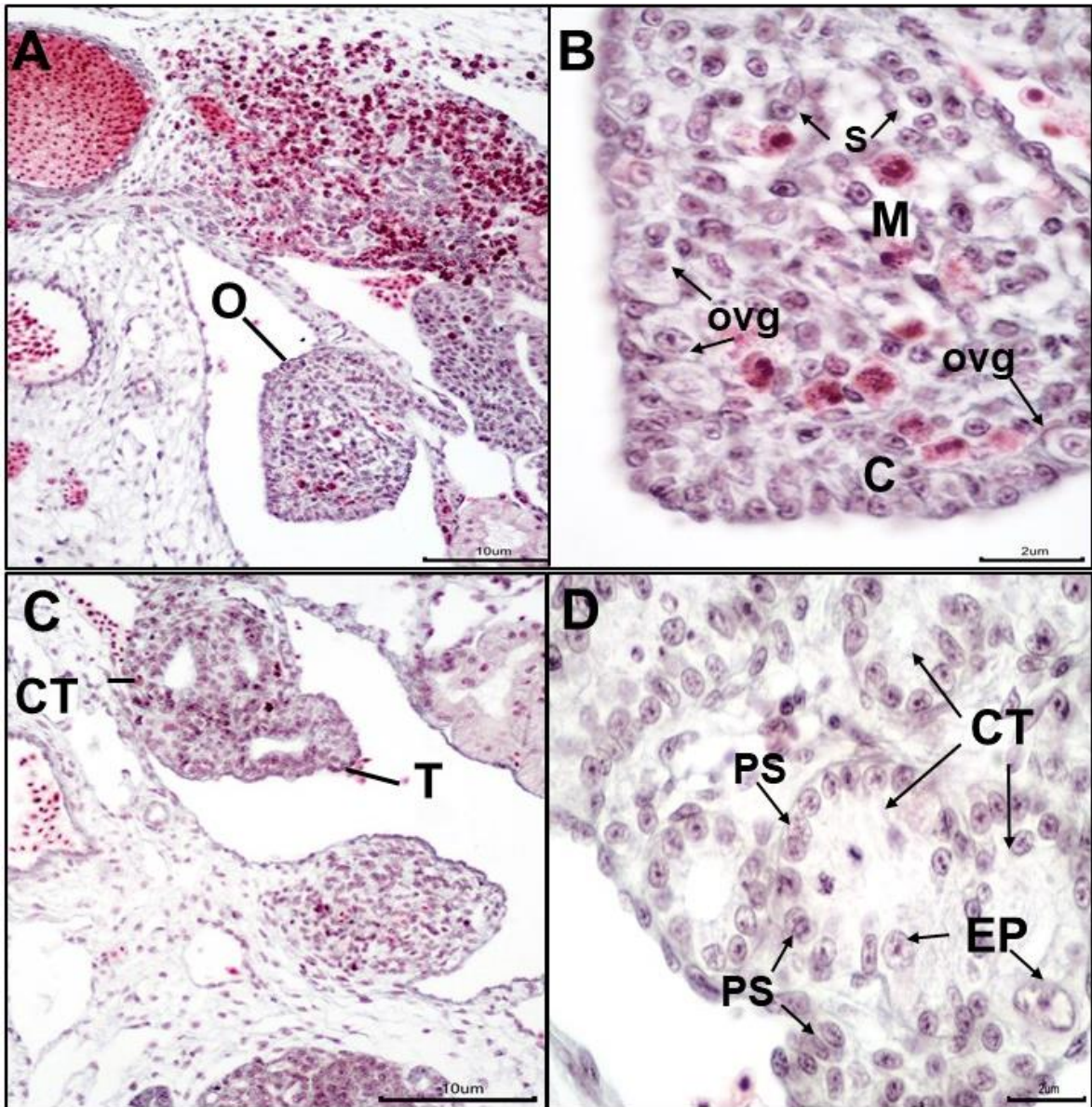


Figura 4. Gónada embrionaria de *Basiliscus vittatus* en estadio 35. A y B) Corte transversal de la región media posterior del cuerpo en donde se observa la gónada femenina. O: Ovario; M: región medular; C: corteza; ovg: ovogonia. **C y D)** Corte transversal de la región media posterior del cuerpo en donde se ve la gónada masculina. T: testículo; EP: espermatogonias; PS: células de Sertoli o células Pre-Sertoli, CT: cordón testicular, algunos con luz en su interior.

- **Estadio 36**

Durante este estadio, el tamaño gonadal está en aumento, es más notable la zona cortical aumentando su espesor entre 2 y 3 capas de células germinales estrechamente relacionadas con las células somáticas o futuras células foliculares en su parte más gruesa, delimitada por una lámina basal de tejido conjuntivo y se observa un mayor número de ovogonias que en el estadio anterior (Fig. 5A y B). Mientras en el caso del desarrollo de testículos, estos son más elongados y la formación de cordones testiculares puede observarse en mayor número sobre la región medular. Dentro de cada cordón testicular son visibles las espermatogonias (Fig. 5C y D).

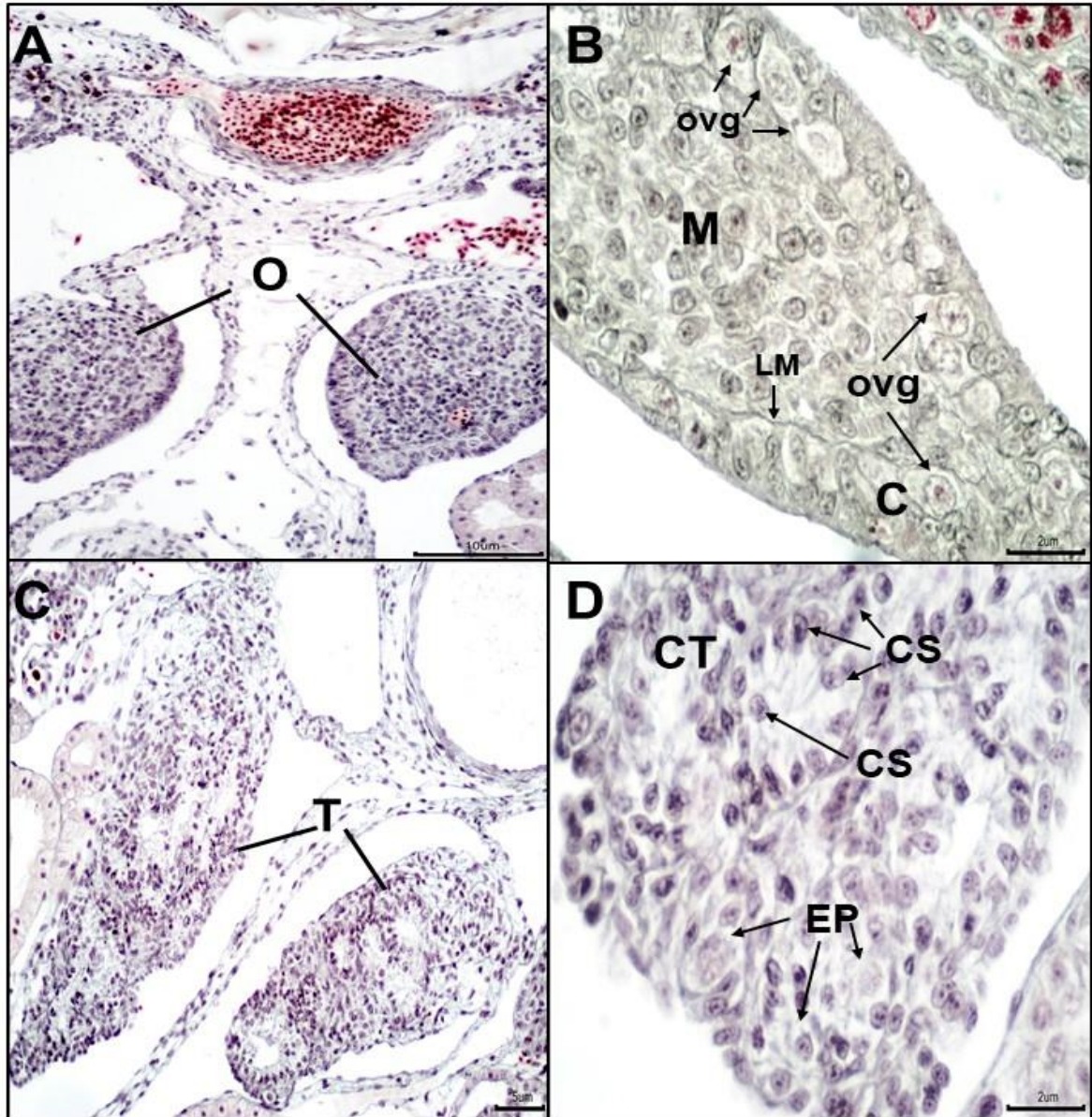


Figura 5. Gónada embrionaria de *Basiliscus vittatus* en estadio 36. A y B) Corte transversal de la región media posterior del embrión en desarrollo en donde se observa la gónada femenina. O: ovario; M: región medular; C: corteza; ovg: ovogonia; LM: lámina basal. **C y D)** Corte transversal de la región media posterior del cuerpo del embrión en desarrollo en donde se observa la gónada masculina. T: testículo; EP: espermatogonia; CS: células de Sertoli; CT: cordón testicular.

- **Estadio 37**

En los ovarios se observan fibras de tejido conjuntivo que delimitan en su totalidad la zona cortical y la región medular. En la región cortical se observa la proliferación de ovogonias vistas en mayor cantidad que en el estadio 36, se observan además en estrecha relación con las células somáticas o foliculares, mientras una laxa zona medular sin células germinales (Fig. 7A y B). En cuanto a los testículos en este estadio, la forma es elongada y curvada, presentan cordones testiculares que se observaron en mayor abundancia que en el estadio 36. En este estadio, todo el testículo está estructurado de cordones testiculares, además espermatogonias de gran tamaño son abundantes, las cuales están más hacia el centro del cordón testicular que en la periferia, mientras las células de Sertoli se encuentran periféricas a los cordones testiculares (Fig. 7C y D).

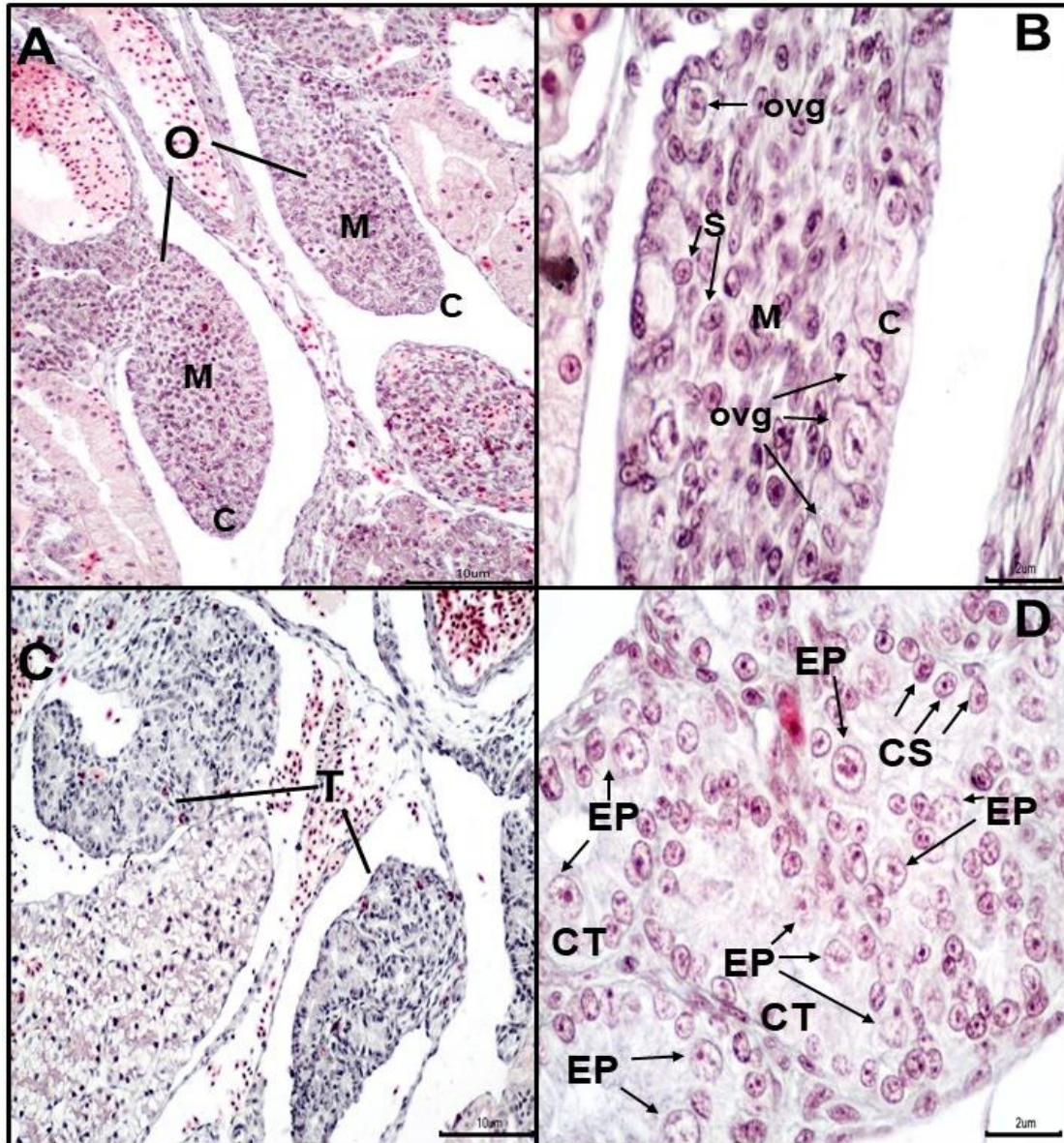


Figura 7. Gónada embrionaria de *Basiliscus vittatus* en estadio 37. A y B) Corte transversal de la región media caudal del embrión en desarrollo, en donde se observa la gónada femenina. O: ovario; M: región medular; C: corteza; ovg: ovogonia; S: Células somáticas o futuras células foliculares. **C y D)** Corte transversal de la región caudal de la gónada masculina. T: testículo; EP: espermatogonias; CT: cordón testicular.; CS: células de Sertoli (todas las células periféricas del cordón testicular).

Proporción sexual fenotípica

Para la muestra de huevos incubados en la segunda fase del experimento térmico ($n = 48$) y que fueron procesados histológicamente, la proporción sexual independientemente del tratamiento térmico no fue afectada ($X^2 = 1.33$, g.l. = 1, $P = 0.24$), tampoco cuando se consideró la temperatura a la cual fueron incubados los huevos: 32°C ($X^2 = 0$ g.l. = 1, $P = 1$), 29°C ($X^2 = 0.88$, g.l. = 1, $P = 0.34$) y 26°C ($X^2 = 1.33$, g.l. = 1, $P = 0.24$).

Adicionalmente, cabe resaltar que el 100% de los embriones utilizados para este estudio mostraron presencia morfológica de órganos intromitentes (hemipenes), observados durante la clasificación de los estadios embrionarios. En este caso, se observó la presencia de los órganos copuladores desde el estadio 34 (observación personal, no incluida en este estudio), pero acentuados morfológicamente a partir del estadio 35. La morfología del estadio 35 corresponde a un lóbulo prominente que se hace ligeramente más grande, bilobulado para el estadio 36 con irrigación sanguínea a lo largo de todo el falo, mientras en el estadio 37 se observa bifurcado y bilobulado con irrigación de sangre sólo en la parte apical (Fig. 8A-F).

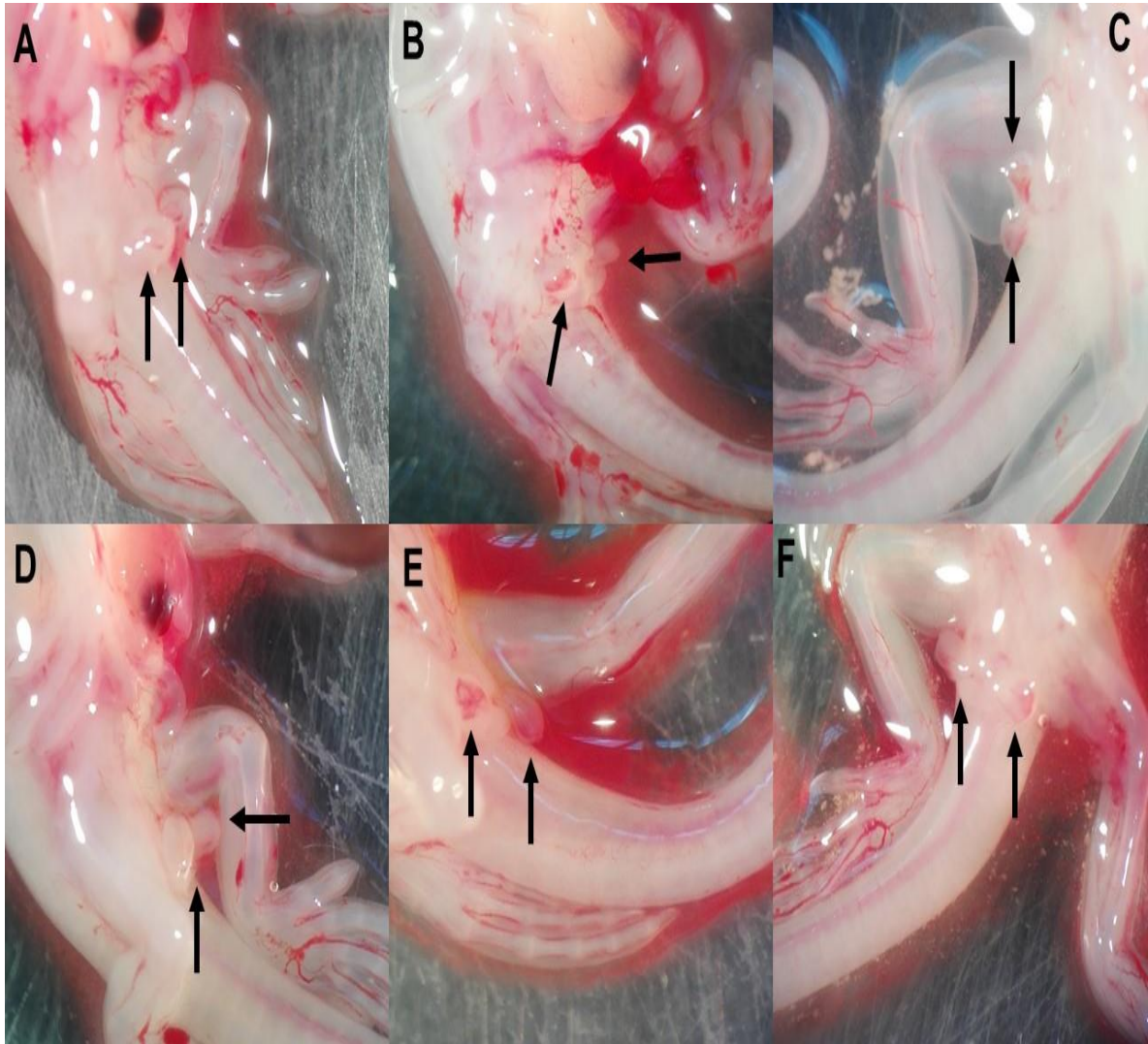


Figura 8. Embriones de *Basiliscus vittatus* en diferentes estadios de desarrollo embrionario: A) 35, B) 36 y C) 37 son hembras genotípicas (XX), mientras D) 35, E) 36 y F) 37 corresponden a machos genotípicos (XY). Las flechas señalan los órganos copuladores.

Genotipo

Proporción sexual genotípica

Para el caso del análisis genético, cada uno de los geles de agarosa que se realizaron fueron observados para conocer la presencia del gen *CAMSAP1* presente en el cromosoma Y (Fig. 9) y por lo tanto la determinación sexual genotípica de un macho. En este sentido, se observó la presencia del gen *CAMSAP1* para 28 muestras (machos), mientras que las 20 muestras restantes solo la presencia esperada del gen autosomal *COL1A1* (control). Considerando el genotipo de las tres categorías térmicas de incubación, la proporción sexual general se ajustó al modelo 50:50 (Machos: Hembras) ($X^2 = 1.33$, g.l. = 1, $P = 0.24$, $n = 28$ Machos, 20 Hembras). De igual forma, cuando se analizaron independientemente las proporciones sexuales genotípicas por tratamiento térmico, las pruebas de chi cuadrada mostraron que a: 32°C ($X^2 = 0$, g.l. = 1, $P = 1$, $n = 9$ Machos, 9 Hembras), 29°C ($X^2 = 0.88$, g.l. = 1, $P = 0.34$, $n = 11$ Machos, 7 Hembras) y 26°C ($X^2 = 1.33$, g.l. = 1, $P = 0.24$, $n = 8$ Machos, 4 Hembras) no mostraron diferencias en las proporciones entre machos y hembras de acuerdo a la presencia del gen *CAMSAP1*.



Figura 9. Fotografía de un gel de 1% de agarosa donde se observa para diferentes embriones de *B. vittatus* la presencia en el DNA genómico del gen *CAMSAP1* lo que indica que el cromosoma Y está presente, mientras que el control autosomal *COL1A1* (control) está presente en machos (color verde) y en hembras (color rosa).

Discusión

Temperatura de incubación en el desarrollo embrionario

Los análisis estadísticos sugieren que la temperatura de incubación entre los diferentes tratamientos tiene un efecto directo sobre el tiempo (días) de incubación que les toma a los embriones cambiar de un estadio embrionario a otro más avanzado. De esta forma, es notorio que en aquellos huevos incubados a 32°C el desarrollo es más rápido respecto a la temperatura intermedia (29°C) y la más baja (26°C). Este patrón fue observado cuando los huevos se exponen a diferentes tratamientos térmicos como el descrito en *Agama impalearis*, en los que también ocurre un crecimiento más rápido cuando los huevos son incubados a 34°C respecto a 24°C (El Mouden et al., 2001). En embriones de *Lepidochelys olivacea*, donde las temperaturas de incubación elevadas promueven un desarrollo y eclosión prematura (Merchant-Larios et al., 1997). En general, el desarrollo embrionario de numerosos escamados se completa más pronto en temperaturas de incubación cálidas que en condiciones térmicas frías como consecuencia de un requerimiento metabólico mayor y a su vez una reducida eficiencia metabólica, por lo que se espera que las crías tengan un tamaño corporal menor al eclosionar (Sexton y Marion, 1974).

La incubación de huevos en Saurópsidos no aves ha revelado la relación del tiempo de incubación y los factores abióticos como la temperatura. Esta información es útil cuando se estiman los límites fisiológicos durante el desarrollo embrionario, lo cual permite establecer subsecuentemente los límites fisiológicos

de las especies impuestos por el uso de hábitat (Sexton y Marion, 1974). Además de permitir comparaciones de los periodos de incubación con otras nidadas, incluso para aquellas especies que tienen más de una nidada al año. Adicionalmente, los efectos a temperaturas de incubación extremas, pero no letales han sido un tema poco estudiado. No obstante, se conoce que pueden tener efectos sobre el éxito de eclosión, crecimiento, fisiología y morfología de los embriones. Estos efectos deben extenderse más allá del periodo de incubación, reflejándose en características de las crías como la sobrevivencia, tasas de crecimiento, conducta, velocidad de escape, etc. (El Mouden et al., 2001).

Efecto térmico en la determinación sexual de *B. vittatus*

Dado que la presencia de hemipenes en los individuos fungió como el indicador morfológico para establecer el sexo fenotípico durante la determinación del estadio embrionario, la proporción sexual fenotípica de los embriones basado en esta característica se esperaría sesgada hacia los machos puesto que se observó la presencia de los órganos copuladores en las tres temperaturas. Sin embargo, el nuevo sistema de micro-cromosomas sexuales XY de *B. vittatus* (Acosta A., Suárez-Varón et al., 2019) mostró que la presencia de hemipenes como un método determinante y definitivo para distinguir entre machos y hembras no fuera útil para dilucidar el mecanismo de determinación sexual. En contraste, los análisis histológicos de la gónada en embriones en diferentes estadios embrionarios sí permitieron identificar específicamente diferencias entre sexos. En este sentido, la proporción sexual fenotípica basada en los resultados

histológicos no mostró un sesgo hacia alguno de los sexos; un modelo de proporción 1:1 (hembra: macho) que se espera en especies con DSG al momento de la eclosión y sin variaciones como en aquellas especies con un mecanismo DST, donde los huevos son muy susceptibles a las oscilaciones térmicas del ambiente (Navara, 2018).

A pesar de que estudios previos demostraron la producción de 100% hembras, resultantes después de incubar huevos de *B. vittatus* a una temperatura constante de 28°C (Suárez-Varón, 2017). El hecho de aumentar 1°C la temperatura de incubación puede influir en la diferenciación gonadal y por tanto sesgar la proporción sexual. Por ejemplo, en *Emys orbicularis* una temperatura de incubación debajo de 28°C promueve 100% machos, mientras arriba de 29.5°C se desarrollan 100% de hembras (Pieu et al., 1998). En el caso de *B. vittatus*, la temperatura de incubación no tuvo efecto en la diferenciación gonadal ya que la evidencia histológica no mostró una estructura celular anormal en la diferenciación de ovarios y testículos, cuando se ha demostrado que la diferenciación sexual es sensitiva a la temperatura de incubación durante un periodo crítico del desarrollo embrionario, principalmente en especies con DST (El Mouden et al., 2001).

Por otra parte, los resultados obtenidos de las PCRs revelaron la presencia del cromosoma Y a partir del análisis con el gen *CAMSAP1* en los diferentes tratamientos térmicos. De igual manera, la proporción sexual genotípica se mantuvo 1:1 (hembra: macho), un aspecto esperado en especies con DSG, coincidiendo la determinación fenotípica y genotípica para cada embrión. Este

resultado es apoyado con los hallazgos de Acosta, Suárez-Varón et al. (2019) donde encontraron que el gen *CAMPSAP1* (el cual codifica para para proteínas con funciones asociadas con la organización de microtúbulos) está ligado exclusivamente al cromosoma Y de los machos.

A diferencia de *CAMPSAP1*, otros genes maestros que se han considerado claves en el proceso de la determinación sexual de Saurópsidos no aves como *JARID2* y *JMJD3* (genes termosensibles durante el periodo de incubación) propuestos como modelos para establecer las bases moleculares y evolución de la DST (Devenson et al., 2017). Cuando estos genes son perturbados por la influencia de temperaturas extremas, se genera una retención de intrones que altera la formación y estructura de proteínas truncas que interrumpen la cascada de señalización de los cromosomas sexuales desencadenando una reversión sexual hacia el sexo opuesto que estaba predeterminado genéticamente (Devenson et al., 2017).

Actualmente, el mecanismo por el cual la temperatura influye sobre la determinación sexual en Squamata no ha sido esclarecido completamente. Sin embargo, se presume involucra factores epigenéticos de la cromatina que alteran la expresión de los genes y/o el splicing de los transcritos, modificando así las señales de diferenciación celular (Whiteley et al., 2018).

Ya que la temperatura de incubación no predice proporciones sexuales sesgadas en *B. vittatus*, la hipótesis de que esta especie muestre DST se rechaza. Aunado a ello, el sistema de micro-cromosomas sexuales, aunque puede aún no estar establecido completamente en los basiliscos, sugiere fuertemente que *B. vittatus*

es una lagartija con determinación sexual genética. Siendo necesario realizar más estudios que estudien la sinergia entre la biología térmica y la biología molecular ligadas a las temperaturas de incubación y cómo éstas pueden moldear características de historia de vida en reptiles.

Sobre la histología

Las gónadas de los Saurópsidos no aves al inicio del desarrollo embrionario se encuentran indiferenciadas, ya que presentan células bipotenciales; la diferenciación hacia ovarios o testículos aún no está establecida. En este aspecto, ya que la diferenciación gonadal de *B. vittatus* no se presenta entre los estadios 35 y 37, tampoco en los estadios a la oviposición 29, 30, 31 y 32 (Capítulo 2). Se propone que el inicio de la diferenciación gonadal debe ocurrir entre los estadios 33 y 34, donde se ha registrado ocurre un cambio morfológico notable en el embrión; testículos y ovarios comienzan a ser distinguibles (Antonio-Rubio et al., 2015). En estos estadios de desarrollo intermedios (33-34) deberían poder observarse numerosas células germinales y somáticas que conformarán los primeros cordones sexuales (Pieau et al., 1998). Respecto a esta hipótesis, el periodo de indiferenciación para *B. vittatus* debe ser muy corto (dos estadios embrionarios), (8.2 días, con huevos incubados a 29°C) similar a otras lagartijas donde ocurre en estadios más tempranos, 30-33 como en *Sceloporus aeneus* y *S. undulatus* (Austin, 1988; Luna- Gómez, 2009).

Similar a estos estadios, parece ser que la diferenciación gonadal inicia simultáneamente en ambos sexos y se mantiene constante durante el desarrollo

hacia la formación completa de ovarios y testículos, este hecho también ha sido registrado en *S. undultus* (Austin, 1988), *N. ocellatus* (Neaves et al., 2006), *Calotes versicolor* (Doddamani, 2006). Sin embargo, también son conocidas especies donde la diferenciación es asincrónica como en *Crocodylus porosus* (Smith y Joss, 1994). El periodo de diferenciación gonadal debe ser variable entre los Saurópsidos no aves dado que la temperatura induce variación en el tiempo que dura la incubación desde las diferencias propias que conlleva el estadio al cual ovipositan las especies y los momentos en que ocurren la morfogénesis, organogénesis, etc. Por ejemplo, huevos de *B. vittatus* les toma en promedio 60 días de incubación a 28°C (Suárez-Varón, 2017) desde la oviposición (estadios 29-32) hasta la eclosión (estadio 40), mientras huevos de otros escamados como *Ctenosaura similis* lo hacen entre 80-98 días a 28-31°C (Fitch, 1973) o *Sceloporus scalaris* 30-44 días entre 15-25°C (Fitch, 1985).

A partir del estadio de desarrollo 35 y hasta el 37 (analizado en este estudio), ambas gónadas ya se encuentran en un grado de diferenciación en el cual son observables a nivel histológico estructuras que permiten discernir entre los dos sexos. Para el caso de los testículos, la zona corteza comienza a degradarse y entra en proceso de regresión, mientras la presencia de cordones testiculares se vuelve abundante en la región medular. En contraste, la diferenciación del ovario promueve que la zona medular se haga laxa por el movimiento de las células germinales hacia la corteza, la cual se engrosa por la presencia de células de origen somático (futuras células foliculares) y las ovogonias en proliferación.

Desarrollo genital

En los machos, el desarrollo de hemipenes vistos como órganos copuladores pareados, presentan gran diversidad morfológica (e. g. forma, ornamentación). Esta diversidad es tal que ha permitido que sean utilizados frecuentemente como característica taxonómica para diferenciar entre especies (Klaczko et al., 2015). Mientras tanto, las hembras exhiben un hemiclitoris, una estructura pareada que ha sido poco estudiada y entendida (Valdecantos y Lobo 2015). Indiferente al mecanismo de determinación sexual, en todos los embriones de *B. vittatus*, independientemente de la presencia o ausencia del cromosoma Y y de la temperatura de incubación a la cual fueron expuestos, la presencia de hemipenes fue conspicua. El desarrollo gonadal en ambos sexos ocurre durante el último tercio del desarrollo embrionario, mientras el genital cuando la diferenciación sexual se ha establecido y donde comienzan a mostrar la morfología característica de forma y estructura (Dufaure y Hubert, 1961; Neaves et al., 2006).

Muchas especies de lacertilios no muestran un dimorfismo sexual a la eclosión y distinguir entre machos y hembras es difícil o imposible a simple vista, por lo que la eversión de hemipenes ha sido el rasgo definitivo y el método más común para distinguir entre sexos en diferentes momentos de la ontogenia (Harlow, 1996; Uller y Olsson 2003). La presencia de hemipenes en machos y hembras durante alguna fase del desarrollo embrionario es un aspecto que ha sido descrito en otros lacertilios, como *Lacerta vivipara* (Dufaure y Hubert, 1961), *N. ocellatus* (Neaves et al., 2006), *Barisia imbricata* (Martínez-Torres et al., 2015)

entre otros. Un patrón poco documentado y similar al de otros escamados desde que el desarrollo gonadal y de hemipenes sucede simultáneamente en ambos sexos durante el desarrollo embrionario; es decir, machos y hembras presentan hemipenes y es hasta el final del desarrollo embrionario donde en las hembras ocurre un proceso que involucra la regresión de hemipenes convirtiéndolos en hemiclitoris, un aspecto poco documentado y registrado solo para algunas especies de lagartijas (e. g. *L. vivípara*, Dufaure y Hubert, 1961; *S. undulatus*, Austin, 1988 y *P. vitticeps*, Whiteley et al., 2018), salvo el caso de *Elgaria multicarinata* y *B. imbricata* cuyas estructuras sexuales permanecen incluso después de su vida postnatal (Telemeco, 2015; Martínez-Torres et al., 2015). No obstante, se conoce que los hemiclitoris también muestran una morfología diversa, esta estructura genital incluye la apariencia de hemipenes rudimentarios, miniatura o más grandes que de los machos (Neaves et al. 2006; Telemeco, 2015). Por ello, es posible que los embriones de *B. vittatus* presenten una forma de pseudohermafroditismo temporal en la cual ovarios y hemipenes están presentes al mismo tiempo a través de múltiples estadios de desarrollo (Whiteley et al., 2018). Aunque son necesarios más estudios sobre este fenómeno, hasta el momento, este fenómeno sólo ha sido registrado para tres especies en Squamata: *N. ocellatus* (Neaves et al., 2006), *B. imbricata* (Martínez-Torres et al., 2015) y *P. vitticeps* (Whiteley et al., 2018).

Adicionalmente, a pesar de la presencia de hemipenes en ambos sexos, el análisis histológico mostró una diferenciación hacia testículos y ovarios que coincidió con la presencia o ausencia del gen *CAMSAP1* ligado al cromosoma

Y; por lo tanto, con el genotipo XX y XY respectivamente. En este estudio se encontró que la regresión de hemipenes en las hembras de *B. vittatus* sucede en estadios de desarrollo avanzados, próximos a la eclosión (estadio 39-40, observación personal) e incluso post eclosión. Mientras que en los estadios analizados (35-37) el desarrollo genital es similar entre ambos sexos.

Dado que en especies sin dimorfismo sexual aparente al nacimiento como lo es *B. vittatus* o *B. imbricata*, el criterio universal para distinguir entre los sexos durante el trabajo de campo radica en observar la presencia o ausencia de hemipenes, un aspecto técnico que tendrá que ser reevaluado en los Squamata con más estudios que involucren características del desarrollo embrionario. Esto podría estar sesgando la proporción sexual a nivel fenotípico y el uso de caracteres morfológicos como hemipenes para catalogar a un individuo como macho debe tomarse con precaución en algunas especies como *B. vittatus*.

Finalmente, es necesario reevaluar el sistema de determinación sexual de Sauropsidos no aves con metodologías y técnicas más sensibles para realizar una mejor caracterización de los mecanismos de determinación sexual en las especies, sobre todo en aquellas que fueron clasificadas con DST al no encontrar cromosomas sexuales en sus cariotipos. Además, el funcionamiento de los mecanismos de determinación sexual en Saurópsidos no aves, permite entender como los efectos del cambio climático influyen directamente las temperaturas de incubación de nidos naturales, sobre todo cuando el 80% de las especies de este taxón es ovíparo. Las variaciones térmicas de incubación afectan el fenotipo de los neonatos y en ocasiones se convierten en efectos deletéreos para

especies con DST y un importante factor en la ecología y distribución de escamados, lo cual altera las proporciones sexuales, causa la pérdida de biodiversidad y aumenta la tendencia a la extinción.

Conclusiones

- La presencia del gen *CAMSAP1-Y* en machos y su ausencia en hembras, confirma que el mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus* es genético con presencia de micro-cromosomas sexuales bajo un sistema cromosómico XY, sin efecto aparente de la temperatura de incubación sobre dicha determinación.
- La temperatura de incubación no tuvo influencia en la diferenciación gonadal de *B. vittatus*. La diferenciación para ambos sexos es simultánea y muy posiblemente ocurre a partir del estadio 34 y acentuada en el 35.
- En *B. vittatus* las condiciones térmicas de experimentación influyen en los días que permanece un embrión en cada estadio de desarrollo embrionario.
- El genotipo y el fenotipo de *B. vittatus* coincidieron en sus respectivos análisis: machos con presencia de cromosoma Y (gen *CAMSAP1*) mostraron diferenciación hacia testículos, mientras que las hembras en ausencia del cromosoma Y hacia ovarios.
- Independientemente de la presencia/ausencia del cromosoma Y y de la temperatura de incubación, la presencia de hemipenes se observó en ambos sexos desde el estadio 34 y más acentuados morfológicamente a partir del estadio 35.

- Es posible que los embriones de *B. vittatus* presenten una forma de pseudohermafroditismo temporal en la cual los ovarios y hemipenes están presentes al mismo tiempo durante el desarrollo.

Conclusiones generales y perspectivas

- El mecanismo de determinación sexual de *B. vittatus* es genético con un sistema cromosómico XY que surgió hace aproximadamente 63 millones de años. La Familia Corytophanidae son el único grupo de Pleurodontos que pasó del sistema XY ancestral a un par más reciente de cromosomas XY. Las fuerzas evolutivas que desencadenaron esta transición no se han establecido con precisión.
- La temperatura a la cual fueron incubados los huevos no mostró efecto aparente en la diferenciación gonadal, pero si en los días que permanece un embrión en cada estadio de desarrollo embrionario. Nuevos experimentos con temperaturas de incubación más extremas podrían develar efectos térmicos sobre la diferenciación sexual. Adicionalmente, incluir el análisis de otros genes maestros termosensibles que se han considerado claves en el proceso de la determinación sexual en Saurópsidos no aves como *JARID2* y *JMJD3* propuestos como modelos para estimar la evolución de la DST y la presencia de organismos con reversión sexual.

- Es necesario realizar comparaciones de este estudio con otros integrantes de la familia Corytophanidae, así como especies que poseen un mecanismo de determinación sexual bimodal y donde se ha encontrado la presencia de reversión sexual dependiente de la temperatura. Son necesarios más esfuerzos para conocer esta característica y generar mejores aproximaciones de la evolución de los mecanismos de determinación sexual en Saurópsidos no aves.
- El sistema de determinación sexual para Saurópsidos no aves necesita ser reevaluado, con metodologías y técnicas más sensibles para realizar una mejor caracterización de los mecanismos de determinación sexual, principalmente en aquellas especies que han sido clasificadas con determinación sexual dependiente de la temperatura al no haber encontrado cromosomas sexuales en sus cariotipos.

Literatura citada

- Acosta, A., Suárez-Varón, G., Rodríguez-Miranda, L., Lira-Noriega, A., Aguilar-Gómez, D., Gutiérrez-Mariscal, M., Hernández-Gallegos, O., Méndez-de-la-Cruz, F. y Cortez, D. (2019). Corytophanids Replaced the Pleurodont XY System with a New Pair of XY Chromosomes. *Genome Biology and Evolution*, 11: 2666-2677.
- Antonio-Rubio, N. R., Villagrán-Santa Cruz, M., Santos-Vázquez, A., y Moreno-Mendoza, N. (2015). Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the oviparous lizard, *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Zoomorphology*, 134: 279–289.
- Austin, H. B. (1988). Differentiation and development of the reproductive system in the iguanid lizard, *Sceloporus undulatus*. *General and Comparative endocrinology*, 72: 351-363.
- Bachtrog, D., Mank, J., Peichel, C., Kirkpatrick, M., Otto, S., Tia-Lynn A., Hahn, M., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., y Vamosi, J. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol*, 12, e1001899.
- Deveson, I., Holleley, C., Blackburn, J., Graves, M., Mattick, P., Waters, P., y Georges, A. (2017). Differential intron retention in Jumonji chromatin modifier genes is implicated in reptile temperature-dependent sex determination. *Science advances*, 3: 1-8.

- Doddamani, L. S. (2006). Differentiation and development of testis in the oviparous lizard, *Calotes versicolor* (Daud.). Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 305A(3): 299-308.
- Dufaure, J., y Hubert, J. (1961). Table de developpement du lezard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara*, Jacquin. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp., 50: 309-327.
- El Mouden, Hassan, E., Znari, M. y Pieau, C. (2001). Effects of incubation temperature on embryonic development and sex determination in the North African agamid lizard, *Agama impalearis*. Herpetological Journal, 11: 101-108.
- Ezaz, T., Quinn, A., Miura, I., Sarre, S., Georges, A., Graves, M. (2005). The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. Chromosome Research, 13: 763-776.
- Fitch, H. S. (1973): A field study of Costa Rican lizards. University of Kansas, Science Bulletin, 50: 39-126.
- Fitch, H. S. (1985): Variation in clutch and litter size in New World reptiles. University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publication, 76: 1-76.
- Gamble, T., Castoe, T., Nielsen, S., Banks, J., Card, J., Schield, D., Schuett, G. y Booth, W. (2017). The discovery of XY sex chromosomes in a *Boa* and *Python*. Current Biology, 27: 1-6.

- Graves J. M. (2008). Weird Animal Genomes and the Evolution of Vertebrate Sex and Sex Chromosomes. *The Annual Review of Genetics*, 42: 565-86.
- Harlow, P. S. (1996). A harmless technique for sexing hatchling lizards. *Herpetological Review*, 27: 71-72.
- Hayes, T. B. (1998). Sex Determination and Primary Sex Differentiation in Amphibians: Genetic and Developmental Mechanisms. *The Journal of Experimental Zoology*, 281: 373-399.
- Holleley, C., O'Meally, D., Sarre, S., Marshall, J., Ezaz, T., Matsubara, Bhumika A., Zhang, X., Georges, A. (2015). Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature*, 7558: 79-82.
- Janzen, F. y Phillips, C. (2006). Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. *Journal Compilation. European Society for Evolutionary Biology*, 19: 1775-1784.
- Klaczko, J., T. Ingram, y Losos, J. (2015). Genitals evolve faster than other traits in *Anolis* lizards. *Journal of Zoology*, 295: 44-48.
- Luna- Gómez, M. I. (2009). Diferenciación y desarrollo de la gónada en el lacertilio ovíparo *Sceloporus aeneus*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Martínez-Torres, M., Rubio-Moreno, B., Piña-Amado, J. J. y Juana, L. (2015). Hemipenes in females of the mexican viviparous lizard *Barisia imbricata* (Squamata: Anguidae): an example of heterochrony insexual development. *Evolution and Development*, 17: 270-277.

- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramírez, S, Moreno-Mendoza, N., y Marmolejo-Valencia, A. (1997). Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 107: 373-385.
- Modi, W. y Crews, D. (2005). Sex chromosomes and sex determination in reptiles. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15: 660-665.
- Navara K. J. (2018). What Went Wrong at Jurassic Park? Modes of Sex Determination and Adaptive Sex Allocation in Reptiles. In: *Choosing Sexes. Fascinating Life Sciences*. Springer, Cham. 155-178.
- Neaves, L., E. Wapstra, D. Birch, J. Girling, y Joss, J. (2006). Embryonic gonadal and sexual organ development in a small viviparous skink, *Niveoscincus ocellatus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305: 74-82.
- Nelson, N., Moore, J., Pillai, S., y Keall, S. (2010). Thermosensitive period for sex determination in the tuatara. *Herpetological Conservation and Biology*, 4: 129-140.
- Nielsen, S., Banks, J. L., Diaz, R. E., Trainor, P. A., y Gamble, T. (2018). Dynamic sex chromosomes in Old World chameleons (Squamata: Chamaeleonidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 1-7.
- Pieau, C., Dorizzi, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G. (1998). Sexual Differentiation of Gonads as a Function of Temperature in the Turtle *Emys*

orbicularis: Endocrine Function, Intersexuality and Growth. The journal of experimental zoology, 281: 400-408.

Pokorná, M. y Kratochvíl, L. (2009). Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? Zoological Journal of the Linnean Society, 156: 168-183.

Pokorná, M., Massimo, G., Kratochvíl, L., Kasai, F., Trifonov, A., O'Brien, P., Caputo, V., Olmo, E., Ferguson-Smith, M., Rens, W. (2011). Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. Chromosoma, 120: 455-468.

Quinn, A. A., A. Georges, S. D. Sarre, F. Guarino., T. Ezaz, y Graves, J. A. M. (2007). Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. Science, 316: 411.

Radder, R. S., Quinn, A., Georges, A., Sarre, S. y Shine, R. (2008). Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. Biology Letters, 4: 176-178.

Rhen, T., y Schroeder, A. (2010). Molecular Mechanisms of Sex Determination in Reptiles. Sexual development, 4: 16-28.

Rice, W. (1996). Evolution of the Y Sex Chromosome in Animals. BioScience, 46: 331-343.

Rovatsos, M., Vukic, J., Pokorná, M.J., Altmanová, M., y Kratochvíl, L. (2016). Conservation of sex chromosomes in lacertid lizards. Molecular Ecology, 1-9.

- Sarre, S. D., Georges, A., y Quinn, A. (2004). The ends of a continuum: genetic and temperature dependent sex determination in reptiles. *BioEssays*, 26: 639-645.
- Sexton, O. J. y Marion K. R. (1974). Duration of Incubation of *Sceloporus undulatus* Eggs at Constant Temperature. *Physiological Zoology*, 47: 91-98.
- Shine, R., Elphick, M. J., y Donnellan, S. (2002). Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population. *Ecology Letters*, 5: 486-489.
- Smith, C., y Joss. J. (1994). Steroidogenic Enzyme Activity and Ovarian Differentiation in the Saltwater Crocodile, *Crocodylus porosus*. *General and Comparative Endocrinology*, 93: 232-245.
- Suárez-Varón, G. (2017). Características de la nidada y de las crías de *Basiliscus vittatus* (Squamata: Corytophanidae). Tesis de Maestría. Universidad autónoma del Estado de México. México.
- Telemeco, R. S. (2015). Sex determination in southern alligator lizards (*Elgaria multicarinata*; Anguidae). *Herpetologica*, 71: 8-11.
- Uller, T. y Olsson, M. (2003). Prenatal sex ratios influence sexual dimorphism in a reptile. *Journal of Experimental Zoology*, 295: 183-187.
- Valdecantos, S. y Lobo, F. (2015). First Report of Hemiclitores in Females of South American Liolaemid Lizards. *Journal of Herpetology*, 49: 291-294.

Viets, B., Wets, M., Ewert, L., y Nelson, C. (1994). Sex-Determining Mechanisms in Squamate Reptiles. *The journal of Experimental Zoology*, 270: 45-56.

Warner, D. A. (2011). Sex determination in reptiles. pp. 1–38 in D. A. Norris and K.H. Lopez (eds.), *Hormones and Reproduction in Vertebrates*. Academic Press, USA.

Whiteley, S. L., Weisbecker, V., Georges, A., Gauthier, A., Whitehead, D. L., y Holleley, C. E. (2018). Developmental asynchrony and antagonism of sex determination pathways in a lizard with temperature-induced sex reversal. *Scientific reports*, 8: 14892.