

## Cariotipo de *Incilius valliceps* (Anura: Bufonidae) y hallazgo de cromosomas sexuales (ZW/ZZ) revelados en macho fenotípico

### Karyotype of *Incilius valliceps* (Anura: Bufonidae) and finding of sex chromosomes (ZW/ZZ) revealed in phenotypic male

Javier Hernández-Guzmán<sup>1</sup> , Lenin Arias-Rodríguez<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Villahermosa, CP 86150, Tabasco, México.

\*Autor de correspondencia: [leninariasrodriguez@hotmail.com](mailto:leninariasrodriguez@hotmail.com)

#### Nota científica

**Recibido:** 30 de marzo 2024

**Aceptado:** 13 de agosto de 2024

**RESUMEN.** El sapo costero *Incilius valliceps*, ha sido poco estudiado y comprendido desde diversas perspectivas biológicas y ecológicas. El objetivo del presente estudio, fue describir el cariotipo típico en mitosis de *I. valliceps* a partir de dos hembras y cinco machos adultos recolectados en dos localidades del estado de Tabasco, México. A todos los especímenes, se les aplicó tratamientos estándar de citogenética. El armado y la interpretación cariotípica se basó en la nomenclatura estándar. El cariotipo típico en mitosis de *I. valliceps* se compone por  $2n=22$  cromosomas. Sin embargo, se observaron dos cariotipos, uno caracterizado por machos homogaméticos (ZZ) con fórmula cromosómica de  $12msm+8T+2A$  (NF= 34) y un macho fenotípico de la localidad La Lima con fórmula cromosómica de hembra genética (ZW) con  $12msm+8T+1stt+1A$  (NF= 36). Los resultados indican, reversión sexual de la hembra genética a macho fenotípico.

**Palabras clave:** Anfibio, reversión sexual, disruptores antropogénicos, cromosomas.

**ABSTRACT.** The coastal toad *Incilius valliceps*, which have been little studied and understood from several biological and ecological perspectives. The aim of the present study was to describe the typical karyotype in mitosis of *I. valliceps* from two females and five adult males from two localities of Tabasco state, Mexico. All specimens were subjected to standard cytogenetic treatment. Assembly and karyotype interpretation were based on standard nomenclature. The typical karyotype in mitosis of *I. valliceps* was integrated by of  $2n = 22$  chromosomes. However, the presence of two types of karyotypes was observed, one characterized by homogametic males (ZZ) with a chromosome formula of  $12msm+8T+2A$  (NF = 34) and a phenotypic male from La Lima with chromosome formula of genetic female (ZW) with  $12msm+8T+1stt+1A$  (NF = 36). The results indicate sexual setback from the genetic female to a phenotypic male.

**Key words:** Amphibian, sex reversal, anthropogenic disruptors, chromosomes.

## INTRODUCCIÓN

En el mundo, la diversidad de organismos vivos está sistematizada por las especies que se registran taxonómicamente a nivel genérico; a veces sin considerar las especies que se extinguen por múltiples razones biológicas y antropogénicas (McKinney 1997, Chichorro *et al.* 2019). Así también, aquellas especies crípticas en las que la taxonomía clásica no ha sido suficiente, y que se han identificado por poseer atributos genéticos a nivel molecular y reproductivo que las hacen diferentes de sus congéneres fenotípicos (Arias-Rodríguez *et al.* 2007b, 2009a). En tal contexto, se han distinguido grupos de organismos con mayor o menor vulnerabilidad, estando entre ellos los anfibios, siendo este grupo uno de los más sensibles al cambio climático global por los efectos de la evaporación, la pérdida de hábitats acuáticos y el incremento de la temperatura (Lertzman-Lepofsky *et al.* 2020).

El sapo costero o sapo verrugoso (*Incilius valliceps* Wiegmann 1833), es una especie nativa de la vertiente Mesoamericana, catalogada en preocupación menor (LC) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2020). En México no es considerada como una especie en riesgo (Barragán-Vázquez *et al.* 2022) con distribución que incluye los estados de Puebla, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo; y hacia el sur hasta Costa Rica (Mendelson III *et al.* 2011, IUCN 2020, Klank *et al.* 2020). Mientras que, en las tierras bajas de Tabasco, forma parte de las tres especies de sapos de la familia Bufonidae con presencia en esta zona del trópico húmedo: sapo costero (*I. valliceps*), sapo de cresta larga (*I. macrocristatus* Firschein y Smith 1957) y el sapo de caña (*Rhinella horribilis* Wiegmann 1833) (Barragán-Vázquez *et al.* 2022).

La información biológica y la distribución geográfica del género *Incilius* ha sido enriquecida durante la última década (Mendelson III *et al.* 2011); así como todo aquello relacionado con caracteres citogenéticos (Cole *et al.* 1968) en número y forma de los cromosomas, que han sido importantes para establecer parámetros cromosómicos constantes en el género. Con todo ello, se ha aceptado 23 especies en México (Frost 2024).

Los estudios de citogenética en el género *Incilius* son mínimos y desactualizados, los últimos con más de 50 años de antigüedad (Sanders y Cross 1964, Cole *et al.* 1968). En dicho contexto, los antecedentes corresponden con la época donde se clasificaba a *I. valliceps* en el género *Bufo*, por lo que, se desconocía que se trataba de dos especies simpátricas con distribución en Texas, Estados Unidos de América y el Norte de México. Posteriormente, Mulcahy y Mendelson III (2000), logran separar y renombrar la especie como *Bufo nebulifer*; y en revisiones posteriores la reclasifican en géneros distintos (Mendelson III *et al.* 2015, Frost 2024, Frost *et al.* 2006a, 2006b). Finalmente, Frost *et al.* (2009) logran ubicar la especie en el género *Incilius*, siendo *I. nebulifer* o sapo nebuloso el nombre aceptado durante el desarrollo del presente trabajo. El sapo nebuloso (*I. nebulifer*), carece de caracterización cromosómica en la actualidad. Sin embargo, la información cariotípica que fue descrita por

Cole *et al.* (1968), debe ser considerada para *I. nebulifer*, y no para el actual *I. valliceps* o sapo costero, debido a la idea conespecífica que se tenía en la época para ambas especies (Mendelson III *et al.* 2015).

Lo anterior, es un ejemplo de la necesidad de actualizar la información citogenética en *I. valliceps* para dilucidar todos los caracteres cariotípicos posibles, de acuerdo con su estatus taxonómico actual, como el número de cromosomas  $2n$ , la clasificación cromosómica, el número fundamental y la posible presencia de heteromorfismo cromosómico. Por todo ello, el objetivo del presente estudio fue el de extender el discernimiento de la citogenética básica y los mecanismos que determinan el sexo genético en el sapo costero *I. valliceps*, mediante la caracterización de los cromosomas mitóticos de hembras y machos de especímenes recolectados en dos localidades de Tabasco, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de recolección y determinación taxonómica

Los especímenes adultos de *I. valliceps* fueron recolectados en la temporada de seca (marzo-mayo) y precipitación (septiembre-noviembre) durante el 2010-2013 y 2018, debido a su poca abundancia. Se recolectaron dos hembras y cinco machos, en los márgenes y playones de la laguna El Guapacal, que es un cuerpo de agua dulceacuícola y pantanoso que se ubica en la Villa Luis Gil Pérez (17° 52'43.05" LN y 93° 04'25.03" LO). Así también, un espécimen macho fue obtenido de los márgenes de la planta de tratamiento de aguas residuales de la zona habitacional denominada La Lima (17° 54'31.65" LN y 92° 56'09.35" LO), ambas localidades del Centro, municipio del estado de Tabasco, sureste de México. La determinación taxonómica, se basó en los caracteres merísticos y morfométricos señalados en las claves para la identificación de los sapos mexicanos de la familia Bufonidae recomendados por Oliver-López *et al.* (2009), Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén (2010), y González-Hernández *et al.* (2021). Así también, considerando el listado actualizado de la herpetofauna de México (Frost 2024) y la lista renovada de las especies de sapos con distribución en Tabasco por Barragán-Vázquez *et al.* (2022). Los adultos, se identificaron por las particularidades de la piel en la región ventral que es de tipo inmaculada, en comparación con la coloración oscura que es típica de las etapas tempranas posteriores a la metamorfosis y de manchas ventrales en los juveniles (Oliver-López *et al.* 2009).

Este estudio y su protocolo, fue evaluado y aprobado por la Comisión Institucional de Ética en Investigación "CIEI" de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, con registro: 0726. La especie aquí mencionada, no se encuentra en la lista de especies protegidas por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2019). A lo largo del desarrollo de esta investigación, se atendieron y cumplieron con las Normas Oficiales Mexicanas para el uso y manejo de

fauna silvestre en laboratorio, establecidos en la NOM-126-ECOL-2000 (SEMARNAT 2001a) y NOM-062-ZOO-1999 (SEMARNAT 2001b).

### **Procedimiento citológico y elaboración de preparaciones cromosómicas**

La técnica empleada es una adaptación de la utilizada por Arias-Rodríguez *et al.* (2008, 2009b). Para ello, todos los especímenes fueron tratados individualmente con colchicina al 0.1% (45 µg g de peso) diluida con citrato de sodio al 0.1% a temperatura ambiente (27.0 ± 0.10 °C), mediante la inyección con una jeringa de insulina sobre la región intraperitoneal y con seis horas de exposición. Posteriormente, fueron sacrificados por hipotermia y se les extrajo el tejido hematopoyético de la médula ósea, corazón y gónadas. Después, los tejidos fueron disgregados delicadamente, mientras se hidrataron empleando una solución de citrato de sodio al 2.0% durante una hora a 38.0 ± 1.0 °C. El tejido fue fijado (en proporción 1:1) durante 72 h con citrato de sodio al 2.0% y una solución fijadora compuesta por metanol frío (4 °C) y ácido acético (4:1). En una centrifuga, los tejidos fijados fueron concentrados en frío (4 °C) durante 15 min a 7 000 r.p.m. y el sobrenadante se reemplazó por el fijador 4:1. Dicha operación, se realizó por cuatro o más veces o hasta que los tejidos quedaran libres de impurezas o de color blanquecino (lo que indica un buen fijado celular), para posteriormente ser conservados a 4 °C por aproximadamente un mes.

Para elaborar las preparaciones cromosómicas, las células de cada tejido fueron goteadas sobre portaobjetos fríos (previamente mantenidos en etanol a 4 °C) desde 1.80 m de altura para que reventaran y con ello, favorecer la dispersión de los campos cromosómicos. Las preparaciones cromosómicas, fueron secadas con la flama de un mechero de alcohol y teñidas (a 37.0 °C) por 50 min con Giemsa diluida al 10% en búfer de fosfatos a pH 7.0. Los residuos depositados en las preparaciones, fueron eliminados con agua destilada.

El sexo fenotípico de los especímenes, se determinó con la disección de un fragmento de tejido gonádico, posteriormente la tinción con la solución madre de Giemsa y observación bajo el microscopio óptico con el protocolo de Arias-Rodríguez *et al.* (2008).

### **Observación microscópica y elaboración del cariotipo**

Las preparaciones cromosómicas fueron analizadas con el microscopio Axio Scope.A1 (Carl Zeiss®) y las mejores metafases se fotografiaron digitalmente con los objetivos 40X + 1.25X y 100X + 1.25X, mediante la AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®) y las herramientas del programa ZEN/2011 (Carl Zeiss Microscopy GmbH®).

La frecuencia de los números cromosómicos de las mejores dispersiones metafásicas, definidas por tener cromosomas bien dispersos, se emplearon para establecer el número modal diploide de cromosomas. Para determinar el cariotipo típico, se emplearon seis metafases mitóticas de excelente calidad y se tomaron imágenes que fueron recortadas en cromosomas individuales, de los cuales se tomaron las medidas en micrómetros (µm) del

brazo corto (p) y largo (q) que sirvieron de base para constituir los pares homólogos de cromosomas.

A los valores de p y q, de cada par homólogo de cromosomas, les fue calculada la media y desviación estándar y posteriormente se les calculó la longitud relativa (LR), es decir, la longitud promedio en  $\mu\text{m}$  de p ó de q, fue dividida por la sumatoria total de p más q del complemento cromosómico en  $\mu\text{m}$ , multiplicando el valor por 100.

Los cromosomas, se ordenaron y clasificaron con base en los parámetros citogenéticos propuestos por Levan *et al.* (1964), como se describe a continuación:

$$\text{Proporción de brazos (r)} = \frac{q}{p}$$

$$\text{Índice centromérico (i)} = \left( \frac{p}{p + q} \right) \times 100$$

$$\text{Diferencia entre brazos cromosómicos (d)} = \frac{(r - 1) \times 10}{r + 1}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tejidos gonádico y somático que fueron empleados para el estudio; solo el de los machos de origen mitótico mostró dispersiones metafásicas, el hematopoyético de la médula ósea fue el que posibilitó el menor número de observaciones cromosómicas; y el tejido cardíaco dio la posibilidad de mayor número de dispersiones cromosómicas que permitieron el desarrollo del presente estudio. En total, se analizaron 24 preparaciones cromosómicas en mitosis, obteniéndose 72 dispersiones metafásicas de excelente calidad, buena dispersión cromosómica y enrollamiento apropiado de la cromatina.

A partir de 72 metafases analizadas, se determinó el número modal diploide de *I. valliceps* con  $2n=22$  cromosomas, de las cuales 64 ( $2n=22$ ) dispersiones cromosómicas representaron el 89% del total examinado, seis ( $2n=18$ ) metafases el 8% y dos ( $2n=26$ ) el 3%. Por otro lado, mediante el análisis de los cálculos citogenéticos realizadas a los cromosomas mitóticos, se estableció que el cariotipo típico diploide ( $2n$ ) se conforma del par cromosómico primero al sexto (pares del 1-6) de cromosomas birrámeos de tipo metacéntrico-submetacéntrico (msm) y del par cromosómico séptimo al décimo (pares del 7-10) cuatro pares de cromosomas monorrámeos de tipo telocéntrico (T) (Figuras 1a-d, Tabla 1). Mientras los cromosomas del último par cariotípico, correspondientes al par décimo primero (par 11), mostraron dos grupos o tipos de conformación: El primer grupo pertenece a los especímenes de la Villa Luis Gil Pérez, el cariotipo mostró un par cromosómico (cromosomas 21 y 22) con elementos de morfología monorrámea de posición centromérica estrictamente terminal y clasificación acrocéntrica (A) (Figuras 1a-b, Par 11).

En el análisis de las metafases del único espécimen macho de la localidad La Lima, se identificó un segundo grupo cromosómico, que manifestó conformación heterogénea del cromosoma 21; con aparente morfología birrámea de un cromosoma tipo subtlocéntrico-telocéntrico (stt) y el cromosoma 22 del citado par once, mostró morfología monorrámea de posición centromérica estrictamente terminal y clasificación acrocéntrica (A) (Figuras 1c-d, Par 11).

La longitud promedio del primer par cromosómico del grupo de los birrámeos de tipo metacéntrico-submetacéntrico (msm) fue de  $17.18 \pm 1.85 \mu\text{m}$  y del último par sexto de tipo msm birrámeo fue de  $5.40 \pm 0.79 \mu\text{m}$ . Así mismo, los cálculos de los cromosomas del cariotipo que corresponden al grupo de los monorrámeos y al séptimo par cromosómico telocéntrico (T), fue de  $3.68 \pm 0.96 \mu\text{m}$  y al décimo par de tipo T de  $1.28 \pm 0.32 \mu\text{m}$ . Finalmente, el par cromosómico onceavo del grupo único de monorrámeos de tipo acrocéntrico (A) tienen medidas promedio de  $1.84 \pm 0.32 \mu\text{m}$  en su último par cromosómico (Tabla 1).

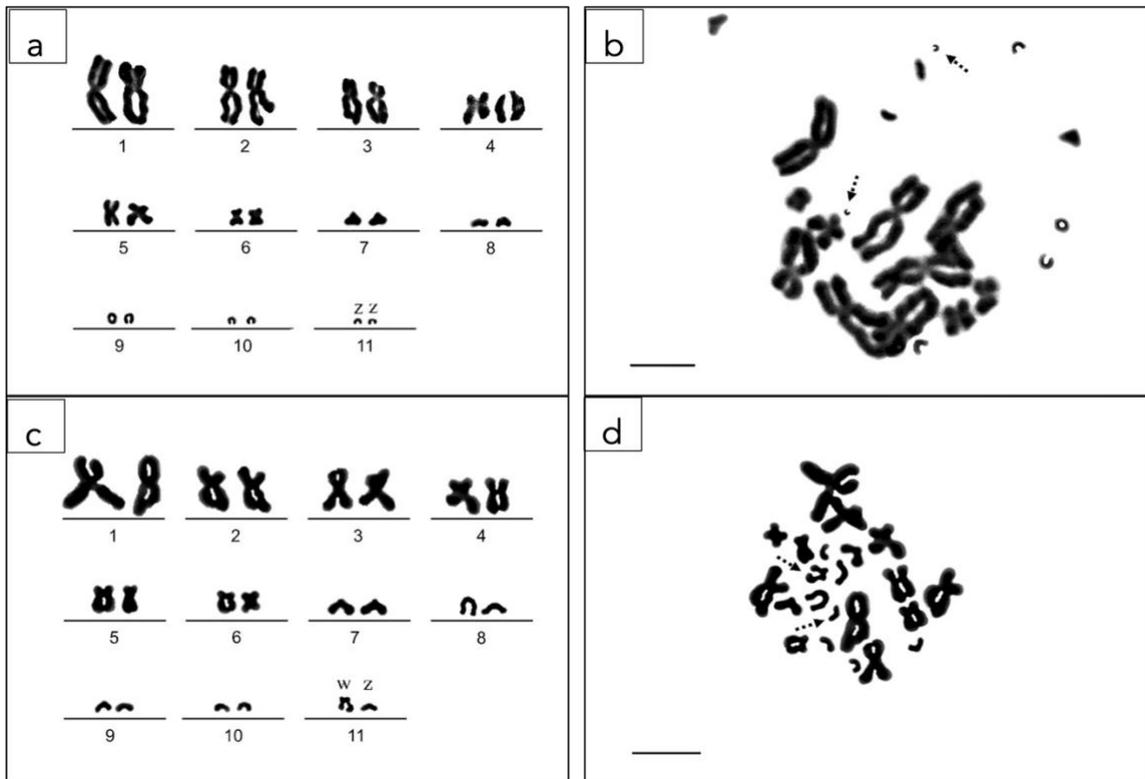
El complemento cariotípico de *I. valliceps* se caracterizó de dos fórmulas cromosómicas en mitosis; la primera de  $12 \text{ msm} + 8 \text{ T} + 2 \text{ A}$  (con número total de brazos cromosómicos o número fundamental (NF) de  $\text{NF} = 34$  brazos) y la segunda fórmula de  $12 \text{ msm} + 8 \text{ T} + 1 \text{ stt} + 1 \text{ A}$  (con  $\text{NF} = 36$  brazos) (Figuras 1a-d, Tabla 1). En ninguna de las metafases que fueron analizadas detalladamente, se pudieron observar presencia de estructuras secundarias como constricciones satelitales o presencia de microcromosomas.

**Tabla 1.** Parámetros citogenéticos del cariotipo típico en mitosis del sapo *I. valliceps* desde la longitud promedio ( $\mu\text{m}$ ), longitud relativa promedio (L.R.) y hasta la clasificación cromosómica.

Par Cromosómico	Longitud ( $\mu\text{m}$ )		L.R. de p	L.R. de q	r	i	d	Clasificación
	p $\pm$ D.E.	q $\pm$ D.E.						
1	7.58 $\pm$ 0.78	9.60 $\pm$ 1.07	9.49	12.0	1.27	44.1	1.18	msm
2	6.30 $\pm$ 1.85	9.53 $\pm$ 1.54	7.89	11.9	1.51	39.8	2.04	msm
3	5.33 $\pm$ 1.14	7.50 $\pm$ 1.42	6.67	9.39	1.41	41.5	1.70	msm
4	3.98 $\pm$ 1.03	5.10 $\pm$ 1.08	4.98	6.39	1.28	43.8	1.24	msm
5	3.60 $\pm$ 1.03	4.95 $\pm$ 1.07	4.51	6.20	1.38	42.1	1.58	msm
6	2.40 $\pm$ 0.37	3.00 $\pm$ 0.42	3.01	3.76	1.25	44.4	1.11	msm
7		3.68 $\pm$ 0.96		4.60			10.0	T
8		2.55 $\pm$ 0.47		3.19			10.0	T
9		1.63 $\pm$ 0.25		2.07			10.0	T
10		1.28 $\pm$ 0.32		1.60			10.0	T
11 (ZZ)		1.84 $\pm$ 0.32		2.30			10.0	A
11 (Z)*	1.01 $\pm$ 0.17	2.84 $\pm$ 0.22					10.0	A
11 (W)*		1.79 $\pm$ 0.12					10.0	stt

D.E.= Desviación estándar, p= brazo corto de cromosoma, q= brazo largo de cromosoma, msm= metacéntrico-submetacéntrico, T= telocéntrico, A= acrocéntrico, stt= subtlocéntrico-telocéntrico, ZZ= Par cromosómico homogamético de los machos, ZW= par cromosómico heterogamético o sexual de las hembras, \*= cromosoma individual.

La presencia estable del número modal de  $2n=22$  cromosomas mitóticos en el cariotipo típico del sapo costero *I. valliceps* que se reporta en este estudio y los datos de los escasos estudios citogenéticos descritos en el género *Incilius* (Bachmann 1970, Bogart 1972), indican que el número cromosómico de  $2n=22$  cromosomas reportado en *I. valliceps*, confirma la correlación citotaxonomía y filogenética de las especies de *Incilius* con los miembros basales de la familia Bufonidae.



**Figura 1.** Cariotipo en mitosis, representativo de machos genéticos con cromosomas homogaméticos (ZZ) del sapo costero *I. valliceps* (a). Metafase con  $2n=22$  cromosomas mitóticos (b). Cariotipo diploide de un macho fenotípico (macho no genético) con cromosomas genético sexuales de hembra heterogamética (ZW) (c). Metafase mitótica con  $2n=22$  cromosomas (d). Las flechas discontinuas representan el par de cromosomas sexuales en cada metafase en b, d y las barras en b y d, representan 10  $\mu$ m.

Así también, con los conteos cromosómicos diploides de los estudios tempranos en el grupo (Bachmann 1970, Beck y Mahan 1979) y los más recientes (Córdova y Descailleaux 1996, Franco-Navia *et al.* 1999). Mientras que, los escasos registros de metafases con conteos cromosómicos de  $2n=18$  y  $2n=26$  cromosomas observados en este estudio, se atribuyen a variaciones de la técnica citogenética, como son la pérdida de elementos cromosómicos, el aislamiento o la integración de uno o más cromosomas, originado por el traslape de metafases cercanas durante el goteo del material biológico, como ha sido reportado en diferentes especies de moluscos, peces, anfibios y reptiles por Arias-Rodríguez *et al.* (2007a, 2011) y Hernández-Guzmán *et al.* (2011, 2014, 2015).

Por otro lado, con base en las observaciones de los cromosomas metafásicos en mitosis de los machos adultos, el cariotipo típico diploide ( $2n$ ) de *I. valliceps* está conformado por dos fórmulas cromosómicas no esperadas; la primera de  $12 \text{ msm} + 8 \text{ T} + 2 \text{ A}$  (con número total de brazos cromosómicos o número fundamental de  $NF= 34$  brazos) y la segunda fórmula de  $12 \text{ msm} + 8 \text{ T} + 1 \text{ stt} + 1 \text{ A}$  (con  $NF= 36$  brazos). La abundante presencia de cromosomas birrámeos de tipo metacéntrico-submetacéntrico (msm) en los cariotipos de los bufónidos, es una particularidad citogenética común en los miembros del grupo con muy pocas excepciones en reducido número de especies (Bachmann 1970, Bogart 1972, Skorinov *et al.* 2018, Bruschi *et al.* 2019); en ello, la confirmación de que los cromosomas cariotípicos que corresponden a los pares cromosómicos del primero al sexto (pares del 1-6) son birrámeos, siendo congruentes con los hallazgos previos en la familia (Figuras 1a-d) y en acuerdo con Bachmann (1970), Bogart (1972), Skorinov *et al.* (2018) y Bruschi *et al.* (2019). Sin embargo, la abundante presencia de cromosomas monorrámeos de tipo telocéntrico (T) del par cromosómico séptimo al décimo primero (pares del 7-11) del cariotipo típico del sapo costero encontrados en el presente estudio y de dos variantes cariotípicas para un mismo sexo fenotípico, se desvían del patrón citológico común en los bufónidos.

En el caso particular del hallazgo en los machos fenotípicos del sapo *I. valliceps*, los resultados de las observaciones citológicas hacen referencia a la presencia de dos tipos de cariotipos; debido a las diferencias observadas en el par cromosómico once (cromosomas 21 y 22) o último par del cariotipo de *I. valliceps*. Lo anterior, posiblemente es un caso excepcional de reversión sexual de la hembra genética a macho fenotípico, situación que se ha comprobado en otros anuros de vida silvestre, especialmente en *Rana clamitans* (Lambert *et al.* 2019).

Las diferencias identificadas son complejas de comparar desde el punto de vista del valor muestral, reproductivo y citológico, esto último debido a la escasez de estudios de tipo cariológico en los miembros del género *Incilius*. Si bien el hallazgo de la variación genética en un espécimen de *I. valliceps* en la localidad La Lima es significativo, surge la interrogante sobre la prevalencia de esta variación en el resto de la población de la especie en dicha localidad. Esta incertidumbre se relaciona con la escasa abundancia de *I. valliceps*, lo que limita la cantidad de muestras disponibles para un estudio más amplio. En el caso del reducido número de individuos recolectados y empleados para el presente estudio o valor muestral, obedeció a que *I. valliceps* es una especie poco abundante en la zona de recolecta (localidades de La Lima y Villa Luis Gil Pérez, municipio de Centro, Tabasco, México) en comparación con la abundancia de *R. horribilis* o sapo cañero a pesar de que ambas especies son nativas de la región sureste y península de Yucatán en México (Lee 2000).

Desde el punto de vista estadístico-muestral, el número de individuos recolectados, no afecta las observaciones cariológicas registradas bajo el microscopio óptico; es decir no hay efectos en la estructura de los cariotipos, debido a que los caracteres cariotípicos o

citológicos son estables en número cromosómico, forma y tamaño de los brazos cromosómicos, entre las células de los especímenes y entre los especímenes de una misma especie (Hernández-Guzmán *et al.* 2011, Bruschi *et al.* 2019). Así también, por ejemplo, en los estudios de citogenética realizados por Bruschi *et al.* (2019) en siete especies de *Rhinella*, en dos de ellas, el número de especímenes empleados para el estudio fue de tan solo tres individuos para dos de estas especies, y de estos individuos, dos fueron macho y uno hembra. Tal circunstancia indica que la disponibilidad de especímenes, es una condicionante que no depende del investigador o recolector, pero sí de la abundancia relativa de la especie. En dicho sentido, en el estudio de riqueza y abundancia de anfibios del Parque Estatal de la Sierra de Tabasco, México por Gerónimo-Torres *et al.* (2022), se señala que solo registraron doce especímenes de *I. valliceps* a lo largo de un estudio de siete meses, dos de ellos en la selva y ocho en vegetación secundaria. Por ello, el estudio realizado en *I. valliceps*, es congruente con el número de especímenes recolectados, pues se enfatiza que la abundancia del sapo costero en las tierras bajas del sureste de México es reducida en diferentes áreas geográficas. Estudios previos en *R. clamitans* o rana clamitans indican que la presencia de reversión sexual natural, puede llegar a representar del 2 al 16% de los individuos en una población (Lambert *et al.* 2019); por lo que, el hallazgo de solo un ejemplar revertido en la localidad de La Lima (Tabasco, México) resulta plausible, siendo que ello representa el 12.5% del total de especímenes muestreados.

Desde el punto de vista citológico las variaciones en la estructura cariotípica, es posible que se originen por dos tipos de circunstancias. La primera está asociada a los efectos de los tratamientos citológicos y la segunda posibilidad, debido a efectos secundarios durante el desarrollo embrionario y la diferenciación sexual. En el primer caso, se ha documentado en varias especies, que la colchicina como alcaloide necesario para inhibir la división celular durante la metafase, puede originar en dependencia del tiempo de exposición y de la concentración, reducción en el tamaño de los cromosomas debido al alto grado de compactación, como secuela secundaria que se produce durante la formación de la cromatina, en la profase del ciclo celular (Morais *et al.* 1991, Arias-Rodríguez *et al.* 2006, Koyani y Saiyad 2011). Sin embargo, los efectos de la colchicina no ocasionan deformaciones drásticas en la estructura del cromosoma, por lo que las diferencias identificadas en los cromosomas (par 11) no pueden adjudicarse como efectos derivados del uso de la colchicina (Figuras 1a-c), que es necesaria y empleada para el desarrollo de estudios citológicos como el actual (Morais *et al.* 1991, Arias-Rodríguez *et al.* 2006, Arias-Rodríguez *et al.* 2009b). La segunda circunstancia o explicación sobre el origen de las diferencias cariotípicas del par cromosómico once (Figuras 1a y 1c); puede estar ligada al heteromorfismo entre uno de los pares cromosómicos de los cariotipos de las hembras y el homomorfismo cromosómico de los machos de una especie en particular. Normalmente esta situación es el reflejo de un mecanismo de determinación sexual regulado por el sexo heterólogo (ZW); y que se ha documentado ampliamente en las hembras de los anfibios

(Schmid *et al.* 1991, Ayling y Griffin 2002, Smith y Voss 2009). Asumiendo con ello, que las hembras son aquellas que tiene como determinante genético el sexo heterogamético (ZW) y los machos el sexo homogamético (ZZ) (Schmid *et al.* 1991, Ayling y Griffin 2002, Smith y Voss 2009).

Evidencias recientes, sugieren que los cambios en el uso de suelo de vegetación original a una condición de uso agrícola, suburbano y urbano han favorecido de forma directa, con incrementos de acuerdo con el grado de desarrollo urbano, la liberación continua de disruptores endocrinos (pesticidas agrícolas, estronas, fitoestrógenos, entre otros) que han afectado las poblaciones silvestres de anfibios (Kloas 2002, Smits *et al.* 2014, Lambert *et al.* 2015). Por ejemplo, desbalanceando y modulando la proporción de sexos natural de la rana *R. clamitans* que en principio está genéticamente determinada (hembras ZW *vs.* Machos ZZ); pero promoviendo que los machos genotípicos (o genéticamente determinados a ser machos) cambien el sexo genéticamente determinado (ZZ) durante la metamorfosis hacia el de hembras (feminización o reversión sexual) fenotípicas (Lambert *et al.* 2015).

En Tabasco, se ha reportado la presencia de contaminantes ambientales como hidrocarburos y metales pesados en los ecosistemas acuáticos y terrestres de la región, (Villanueva y Botello 1992, Fiedler *et al.* 2009, De la Cruz-Pons *et al.* 2012, Ramos-Herrera *et al.* 2012) entre otros compuestos de origen urbano aún no identificados, debido a la carencia de estudios. Sin embargo, los componentes xenobióticos junto con los hidrocarburos y metales pesados, han sido señalados como responsables del origen de los microcromosomas tipo "B" o microfragmentos de cromatina, cuyo origen son la fragmentación de los cromosomas somáticos que están presentes de modo atípico en el genoma de algunas especies acuáticas de Tabasco como: *Petenia splendida* (Günther 1862), *Atractosteus tropicus* (Gill 1863), *Smilisca baudinii* (Duméril y Bibron 1841), *Kinosternon leucostomum leucostomum* (Duméril y Bibron 1851), *Trachemys venusta venusta* (Gray 1856) y *Staurotypus triporcatus* (Wiegmann 1828) (Arias-Rodríguez *et al.* 2007a, 2008, 2009b, Hernández-Guzmán *et al.* 2011, 2014).

El espécimen macho recolectado en la localidad de La Lima, se colectó en un hábitat perturbado por desechos y componentes de las aguas residuales de la zona residencial. En este sentido, considerando el concepto y la importancia de los xenobióticos como sustancias extrañas o ajenas al organismo, que tienen su origen en todos aquellos productos de origen natural, industrial o artificial, como los fármacos, aditivos, contaminantes ambientales entre otros (Bender y Murray 2016) y los efectos en los ecosistemas naturales y los organismos que allí habitan como ha sido ampliamente documentado (Kloas 2002, Arias-Rodríguez *et al.* 2007b, 2008, 2009b, Hernández-Guzmán *et al.* 2011, 2014, Smits *et al.* 2014, Lambert *et al.* 2015). Se puede considerar que las variaciones en el par 11 de cromosomas que integran los dos cariotipos del sapo costero *I. valliceps* observadas en este estudio, corresponden a una hembra genética o ZW que

probablemente por influencia de disruptores endocrinos y genéticos (xenobióticos), modificó los mecanismos que conducen a determinar el sexo genético normal durante los primeros estadios de desarrollo embrionario (o reversión sexual) hacia la de macho fenotípico. El hallazgo no es una sorpresa, si consideramos la hipótesis documentada por Arias-Rodríguez *et al.* (2007a, 2008, 2009b) y Hernández-Guzmán *et al.* (2014) sobre la presencia de microcromosomas “B” en *P. splendida*, *A. tropicus*, *S. baudinii*, *K. l. leucostomum*, *T. v. venusta* y *S. triporcatus*, pues ambos procesos (microcromosomas “B” *vs.* reversión sexual) tienen señalamientos de un origen basado en los efectos de disruptores ambientales de origen antropogénico.

Si bien, los estudios citogenéticos, como el detallado en el presente reporte, no son del todo concluyentes, siguen abriendo ventanas de oportunidades ya que son valiosos porque contribuyen con la descripción de información sobre la genética básica, la composición cromosómica de las especies. Lo que permite avanzar en la comprensión de su evolución y las relaciones taxonómicas de la amplia biodiversidad mexicana. Se confirmó que el cariotipo mitótico del sapo costero *I. valliceps* está conformado por 22 cromosomas, como ha sido documentado en otras especies de sapos en la familia Bufonidae. Existe variación en la clasificación cromosómica, por la presencia de cromosomas de tipo birrámeos y monorrámeos, una característica única en la familia Bufonidae. También se identificaron caracteres cariológicos que concuerdan con la anatomía de los cromosomas heteromórficos o sexuales. Lo anterior, evidencia de la importancia de continuar con nuevas investigaciones que permitan monitorear desde la perspectiva citogenética, la composición cromosómica y cariotípica de otras poblaciones de *I. valliceps*, así como de otras especies de anfibios nativos, que permitan revelar caracteres citogenéticos hasta ahora desconocidos y que no han sido descritos.

### AGRADECIMIENTOS

El primer autor J.H.G. agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) de México el apoyo otorgado mediante el Programa Nacional de Becas de Doctorado (CVU:378486). A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por todas las facilidades para realizar los estudios de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales. Esta investigación fue apoyada por el proyecto sin financiamiento 799, registrado en la UJAT por L.A.R.

### CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

### LITERATURA CITADA

Arias-Rodríguez L, González-Hermoso JP, Fletes-Regalado H, Rodríguez-Ibarra LE, del Valle-Pignataro G (2007a) Cariotipo de los caracoles de tinte *Plicopurpura pansa* y

- Plicopurpura columellaris* (Gastropoda: Murucidae). *Revista de Biología Tropical* 55(3/4): 853-866. <https://doi.org/10.15517/rbt.v55i3-4.5961>.
- Arias-Rodríguez L, Ibarra-Castro L, Páramo-Delgadillo S (2008) Los cromosomas mitóticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). *Revista de Biología Tropical* 56(2): 895-907. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.5632>.
- Arias-Rodríguez L, Indy JR, Ahumada-Hernández RI, Barragán-Cupido H, Ávalos-Lázaro AA, Páramo-Delgadillo S (2011) Caracterización cariotípica en mitosis y meiosis del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). *Revista de Biología Tropical* 59(2): 683-692. <https://doi.org/10.15517/rbt.v0i0.3132>.
- Arias-Rodríguez L, Morishima K, Arai K (2007b) Genetically diversified populations in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* inferred from newly developed microsatellite markers. *Molecular Ecology Notes* 7(1): 82-85. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01536.x>.
- Arias-Rodríguez L, Morishima K, Arai K (2009a) Inter-population difference in microsatellite-centromere map distances in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyological Research* 56: 126-132. <https://doi.org/10.1007/s10228-008-0077-7>.
- Arias-Rodríguez L, Páramo-Delgadillo S, Contreras-Sánchez WM, Álvarez-González CA (2009b) Cariotipo del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) y variación cromosómica en sus larvas y adultos. *Revista de Biología Tropical* 57(3): 529-539. <https://doi.org/10.15517/rbt.v57i3.5473>.
- Arias-Rodríguez L, Páramo-Delgadillo S, Durán-González AL (2006) Caracterización citogenética del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces: Cichlidae). *Revista de Biología Tropical* 54(1): 35-42. <https://doi.org/10.15517/rbt.v54i1.13986>.
- Ayling LJ, Griffin DK (2002) The evolution of sex chromosomes. *Cytogenetics and Cells Genetics* 99(1/4): 125-140. <https://doi.org/10.1159/000071584>.
- Bachmann K (1970) Specific nuclear DNA amounts in toads of the genus *Bufo*. *Chromosoma* 29(3): 365-374. <https://doi.org/10.1007/BF00325949>.
- Barragán-Vázquez MR, Ríos-Rodas L, Fucsko LA, Porrás LW, Mata-Silva V, Rocha A, DeSantis DL, García-Padilla E, Johnson JD, Wilson LD (2022) The herpetofauna of Tabasco, Mexico: composition, distribution, and conservation status. *Amphibian & Reptile Conservation* 16(2): 1-61.
- Beck ML, Mahan JT (1979) Ammoniacal silver staining of nucleolar organizer regions in four species of *Bufo*. *Copeia* 1979(2): 341-345. <https://doi.org/10.2307/1443422>.
- Bender DA, Murray RK (2016) Metabolismo de los xenobióticos. En Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil P (eds). Harper. *Bioquímica ilustrada* 30e. McGraw Hill. Ciudad de México, MX. Pp. 583-588.
- Bogart JP (1972) "Karyotypes". En: Blair WF (ed) *Evolution in the genus Bufo*. University of Texas Press. Texas, US. pp. 171-195.

- Bruschi DP, Sousa DY, Soares A, De Carvalho KA, Busin CS, Ficanha NC, Lima AP, Andrade GV, Recco-Pimentel SM (2019) Comparative cytogenetics of nine populations of the *Rhinella* genus (Anura, Bufonidae) with a highlight on their conservative karyotype. *Genetics and Molecular Biology* 42(2): 445-451. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0139>.
- Canseco-Márquez L, Gutiérrez-Mayén MG (2010) Anfibios y reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fundación para la Reserva de la Biósfera Cuicatlán, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ciudad de México, México. 302p.
- Chichorro F, Juslén A, Cardoso P (2019) A review of the relation between species traits and extinction risk. *Biological Conservation* 237: 220-229. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.07.001>.
- Cole CJ, Lowe CH, Wright JW (1968) Karyotypes of eight species of toads (Genus *Bufo*) in North America. *Copeia* 1968(1): 96-100. <https://doi.org/10.2307/1441555>.
- Córdova JH, Descailleaux J (1996) Tres cariotipos diferentes y un híbrido en poblaciones naturales de *Bufo marinus* (Amphibia: Anura) en Perú. *Theorema* 5(7): 13-28.
- De la Cruz-Pons A, Zavala-Cruz J, Guerrero-Peña A, Salgado-García S, Lagunes-Espinoza LC, Gavi-Reyes F (2012) Metales pesados en suelos cultivados con caña de azúcar en la Chontalpa Tabasco. *Universidad y Ciencia* 28(2): 119-130. <https://doi.org/10.19136/era.a28n2.20>.
- Fiedler S, Siebe C, Herre A, Roth B, Cram S, Stahr K (2009) Contribution of oil industry activities to environmental loads of heavy metals in the Tabasco lowlands, Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution* 197: 35-47. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9789-6>.
- Franco-Navia JF, Iturriaga-Luna EK, Ochoa-Vizarreta R (1999) Los cromosomas del sapo *Bufo spinulosus* (Amphibia – Anura), del Cusco. *Situa* 8(15): 55-58.
- Frost DR (2024) Species count for country: Mexico. [https://amphibiansoftheworld.amnh.org/content/search?subtree=&subtree\\_id=&country%5B%5D=525&search\\_type=count](https://amphibiansoftheworld.amnh.org/content/search?subtree=&subtree_id=&country%5B%5D=525&search_type=count). Fecha de consulta: 27 marzo de 2024.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, De Sá RO, Channing A, Wilkinson M, Donnellan S, Raxworthy CJ, Campbell JA, Blotto BL, Moler P, Drewes RC, Nussbaum RA, Lynch JD, Green DM, Wheeler WC (2006a) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1-291. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2006\)297\[0001:TATOL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2006)297[0001:TATOL]2.0.CO;2).
- Frost DR, Grant T, Mendelson III JR (2006b) *Ollotis* Cope, 1875 is the oldest name for the Genus currently referred to as *Cranopsis* Cope, 1875 (Anura: Hyloides: Bufonidae). *Copeia* 2006(3): 558. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2006\)2006\[558:OCITON\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2006)2006[558:OCITON]2.0.CO;2).

- Frost DR, Mendelson JR, Pramuk J (2009) Further notes on the nomenclature of middle American toads (Bufonidae). *Copeia* 2009(2): 418. <https://doi.org/10.1643/CH-08-204>.
- Gerónimo-Torres JC, Barragán-Vázquez MR, Ríos-Rodas L (2022) Incorporando la distintividad taxonómica en estudios de diversidad: Anfibios del Parque Estatal de la Sierra de Tabasco, México. *Ecosistemas* 31(2): 2294. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2294>.
- González-Hernández AJX, Garza-Castro JM, Balderas-Valdivia CJ (2021) Manual de identificación de la herpetofauna de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, MX. 60p.
- Hernández-Guzmán J, Arias-Rodríguez L, Indy JR (2011) Los cromosomas meióticos de la rana arborícola *Smilisca baudinii* (Anura: Hylidae). *Revista de Biología Tropical* 59(1): 355-362. <https://doi.org/10.15517/rbt.v59i1.3204>.
- Hernández-Guzmán J, Arias-Trinidad A, Islas-Jesús RE, Fraire-Vázquez A, De la Cruz-Izquierdo RI, García-Guzmán NC, Ruiz X (2015) Cromosomas, lesión del ADN y malformación nuclear en la tortuga dulceacuícola *Kinosternon leucostomum* (Testudines: Kinosternidae). *The Biologist* 13(2): 201-211.
- Hernández-Guzmán J, Indy JR, Yasui GS, Arias-Rodríguez L (2014) Los cromosomas de las tortugas tropicales: *Kinosternon leucostomum*, *Trachemys scripta* y *Staurotypys triporcatus* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). *Revista de Biología Tropical* 62(2): 671-688. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i2.10843>.
- IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. *Incilius valliceps*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T87633006A53951218.en>. Fecha de consulta: 14 agosto de 2022.
- Klank J, Chaves G, Arias E (2020) Range expansion of the gulf coast toad, *Incilius valliceps* (Wiegmann 1833) (Anura, Bufonidae), from Costa Rica. *Check List* 16(3): 753-757. <https://doi.org/10.15560/16.3.753>.
- Kloas W (2002) Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *International Review of Cytology* 216: 1-57. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(02\)16002-5](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(02)16002-5).
- Koyani PR, Saiyad SS (2011) Study of effect of colchicine exposure on length of chromosome during mitosis. *Journal of Anatomical Society of India* 60(2): 177-180. [https://doi.org/10.1016/S0003-2778\(11\)80020-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2778(11)80020-1).
- Lambert MR, Giller GSJ, Barber LB, Fitzgerald KC, Skelly DK (2015) Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(38): 11881-11886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501065112>.

- Lee JC (2000) A field guide to the amphibians and reptiles of the Maya world: The lowlands of Mexico, northern Guatemala and Belize. *Cornell University Press. New York, USA.* 416p.
- Lertzman-Lepofsky GF, Kissel AM, Sinervo B, Palen WJ (2020) Water loss and temperature interact to compound amphibian vulnerability to climate change. *Global Change Biology* 26(9): 4868-4879. <https://doi.org/10.1111/gcb.15231>.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52(2): 201-220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>.
- McKinney ML (1997) Extinction vulnerability and selectivity: Combining ecological and paleontological views. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 28: 495-516. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.495>.
- Mendelson III JR, Kinsey CT, Murphy JB (2015) A review of the biology and literature of the gulf coast toad (*Incilius nebulifer*), native to Mexico and the United States. *Zootaxa* 3974(4): 517-537. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3974.4.4>.
- Mendelson III JR, Mulcahy DG, Williams TS, Sites Jr JW (2011) A phylogeny and evolutionary natural history of mesoamerican toads (Anura: Bufonidae *Incilius*) based on morphology, life history, and molecular data. *Zootaxa* 3138(1): 1-34. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3138.1.1>.
- Morais L, Queiroz A, Viegas W (1991) Differential effects of colchicine in genotypes with one or more haploid sets. *Cytologia* 56(2): 157-164. <https://doi.org/10.1508/cytologia.56.157>.
- Mulcahy DG, Mendelson III JR (2000) Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*, based on molecular evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17(2): 173-189. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0827>.
- Oliver-López L, Woolrich-Piña GA, Lemos-Espinal JA (2009) La familia Bufonidae en México. 1ra Edición. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México, México. 139p.
- Ramos-Herrera S, Broca-Martínez LF, Laines-Canepa JR, Carrera-Velueta JM (2012) Tendencia de la calidad del agua en ríos de Tabasco, México. *Ingeniería* 16(3): 207-217.
- Sanders O, Cross JC (1964) Relationships between certain north american toads as shown by cytological study. *Herpetologica* 19(4): 248-255.
- Schmid M, Nanda I, Steinlein C, Kausch K, Epplen JT, Haaf T (1991) Sex determining mechanisms and sex chromosomes in amphibian. En: Green DM, Sessions SK (eds) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press. New York, US. pp. 393-430.

- SEMARNAT (2001a) Norma Oficial Mexicana NOM-126-ECOL-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. [https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3358/1/nom-126-semarnat-\(2000\).pdf](https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3358/1/nom-126-semarnat-(2000).pdf). Fecha de consulta: 14 de julio de 2024.
- SEMARNAT (2001b) Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf). Fecha de consulta: 14 de julio de 2024.
- SEMARNAT (2019) Modificación del anexo normativo III, lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#gsc.tab=0). Fecha de consulta: 14 de julio de 2024.
- Skorinov DV, Bolshakova DS, Donaire D, Pasyukova RA, Litvinchuk SN (2018) Karyotypic analysis of the spined toad, *Bufo spinosus* Daudin, 1803 (Amphibia: Bufonidae). Russian Journal of Herpetology. 25(4): 253-258. <https://doi.org/10.30906/1026-2296-2018-25-4-253-258>.
- Smith J, Voss S (2009) Amphibian sex determination: segregation and linkage analysis using members of the tiger salamander species complex (*Ambystoma mexicanum* and *A. t. tigrinum*). Heredity 102: 542-548. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.15>.
- Smits AP, Skelly DK, Bolden SR (2014) Amphibian intersex in suburban landscapes. Ecosphere 5(1): 1–9. <https://doi.org/10.1890/ES13-00353.1>.
- Villanueva S, Botello AV (1992) Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe mexicano: una revisión. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 8(1): 47-61.