

“Cuando este grupo sea estudiado seriamente se mostraran sus atractivos, los cuales igualaran o sobrepasaran a los de otras familias. Las innumerables modificaciones de su cuerpo, las hermosas adaptaciones a sus hábitats y el maravilloso desarrollo de sus estructuras los hacen un taxón ampliamente diverso... esto es lo que distingue a los poliplacóforos y los hace los más interesantes de entre los moluscos”

Henry A. Pilsbry, en el prefacio del manual de malacología y conchiliología de George Tyron, 1893



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Caracterización morfológica y
genética de dos especies de quitones,
Callistochiton sp. y *Stenoplax* sp.
(Mollusca: Polyplacophora) de
Guerrero, México**

**Tesis
que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

**Presenta
Adriana Reyes Gómez**

Zapopan, Jalisco

17 de Julio de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Caracterización morfológica y genética de dos especies de quitones, *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. (Mollusca: Polyplacophora) de Guerrero, México

Tesis
que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta

Adriana Reyes Gómez

Director

Dr. Eduardo Ríos Jara

Zapopan, Jalisco

17 de Julio de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Caracterización morfológica y genética de dos especies de quitones, *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. (Mollusca: Polyplacophora) de Guerrero, México

por

Adriana Reyes Gómez

Aprobado por:



Dr. Eduardo Ríos Jara
Director de tesis e integrante del jurado

22 Junio 2017
Fecha



Dra. Ofelia Vargas Ponce
Asesor del comité particular e integrante del jurado

22 Junio 2017
Fecha




Dr. Leopoldo Díaz Pérez
Asesor del comité particular e integrante del jurado

22 - Junio - 2017
Fecha



M.C. Cristian M. Galván Villa
Asesor del comité particular e integrante del jurado

22/Junio/2017
Fecha



Dr. Manuel Ayón Parente
Integrante del jurado

22/Jun/2017
Fecha

*A mis Abuelos, por su ejemplo de vida y espíritu firme,
pero sobre todo por su trabajo duro y extenuante,
que me ofreció un mejor futuro.*

*A mi Mami, porque a través de ella la vida es más
amable y humana, y por enseñarme que la excelencia
se alcanza con años y años de pasión, esfuerzo y una
fuerte dosis de amor.*

*A mis queridos hermanos, por mantener mis pies
en tierra firme, por su lealtad y acompañamiento.*

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Eduardo Ríos Jara por su apoyo intelectual y financiamiento para llevar a cabo este estudio, por su guía y consejo. A la Dra. Ofelia Vargas Ponce, por financiar los análisis genéticos, por poner a mi disposición apoyo técnico, quipo, reactivos y espacio en su laboratorio; por sus sugerencias para poner en orden el contenido de esta tesis. A mi comité tutorial Dr. Leopoldo Díaz Pérez, M.C. Cristian M. Galván Villa y Dr. Manuel Ayón Parente, por las horas que le dedicaron a la revisión de este escrito y por su aporte de ideas y redacción para mejorar esta tesis.

Al laboratorio de Sistemática Molecular del Departamento de Botánica, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, especialmente a la Dra. Pilar Zamora Tavares, porque la obtención de las secuencias del gen COI y su análisis fue posibles gracias a las incontables horas que le dedicó a mis muestras y a mi proceso de aprendizaje, por su disposición, por sus conocimientos compartidos y por su amistad.

A mis amigos y colegas de la Unidad académica de Ecología Marina de la Universidad Autónoma de Guerrero, especialmente al Dr. Rafael Flores Garza y a la Dra. Lizeth Galeana Rebolledo, por proporcionar prontamente la mayoría del material biológico analizado en este estudio.

Al Dr. Michael E. Hendrickx, por permitirme realizar mi estancia de investigación y depositar el material tipo en la Colección de Invertebrados Bentónicos de la Unidad Académica de Mazatlán, ICMYL, UNAM. Especialmente al Dr. José Salgado Barragán por tomar y editar las fotos de *C. expressus* y *C. colimensis*.

A mis colegas por enviar material fresco para el análisis genético y morfológico de este estudio, Dr. Douglas Eernisse de la Universidad de Fullerton, California, EUA, por proporcionar individuos de *S. mariposa* y *L. serrata* de La Paz, B.C.S.; al Dr. Cedar García-Ríos de la Universidad de Puerto Rico, Humacao por donar un individuo de *C. expressus* de El Salvador.

Al Instituto de Biología, UNAM en la ciudad de México por el acceso a los laboratorios de fotografía, especialmente a la M. C. Berenit Mendoza Garfias por dedicarle varios meses y numerosas sesiones a la toma de las imágenes de microscopía electrónica.

Al Dr. Miguel Avalos Borja del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por el acceso al microscopio electrónico de barrido para la toma de las imágenes de *C. expressus* y *C. colimensis*; especialmente a la técnica M. C. Ana Iris Peña Maldonado por las horas que dedicó a mis muestras y la toma de las fotografías.

A la Dra. Mónica Anabel Ortiz Arellano y a la Psic. Laura Delia Hernández Hernández por su apoyo en acomodarme en sus casas durante mi estancia en Mazatlán.

A mis amigas y colegas, Q.F.B. Mónica Limón Corona y I.B.T. Karla María Nuñez Gavica (Yeye), quienes me ofrecieron su apoyo moral e intelectual durante el programa de la maestría, pero sobre todo por su amistad incondicional.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE APÉNDICES.....	xi

CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción General.....	4
Antecedentes.....	5
Clase Polyplacophora	
Diagnosis.....	6
Caracteres morfológicos.....	8
Sistemática.....	15
Familia Ischnochitonidae	
Género <i>Callistochiton</i>	17
Género <i>Stenoplax</i>	19
Objetivo general y objetivos particulares.....	21
Referencias.....	22
Contenido de los capítulos.....	26
 CAPITULO 1. Caracterización morfológica de <i>Callistochiton</i> sp. y <i>Stenoplax</i> sp. de Guerrero	
Resumen.....	27
Introducción.....	28
Justificación.....	29
Objetivo.....	30

Materiales y Métodos	
Desarticulación de los individuos.....	30
Microscopia electrónica de barrido.....	31
Microscopía Multifocal.....	33
Resultados	
Descripciones morfológicas y comentarios taxonómicos	
<i>Callistochiton</i> sp.....	34
<i>Callistochiton elenensis</i>	37
<i>Callistochiton colimensis</i>	39
<i>Callistochiton expressus</i>	42
<i>Stenoplax</i> sp.....	44
<i>Stenoplax mariposa</i>	47
<i>Stenoplax limaciformis</i>	49
Discusión.....	51
Referencias.....	54

CAPITULO 2. Caracterización genética de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. de Guerrero

Resumen.....	90
Introducción.....	91
ADN mitocondrial (ADNmt).....	93
Gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI).....	93
Utilidad de las herramientas genéticas en el estudio de la	
Clase Polyplacophora.....	95
Objetivos.....	95
Justificación.....	95
Materiales y Métodos	
Extracción de ADN.....	96
Amplificación del gen COI.....	98
Secuenciación.....	100

Resultados.....	104
Discusión.....	107
Referencias.....	109
Discusión General.....	114

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. *Callistochiton expressus* (Carpenter, 1865), individuo de 8 mm de longitud, La Unión Maculis, El Salvador, CBUPRH2083. Se muestra la forma dorso-ventralmente aplanada del cuerpo de los quitones; el plano anterior y posterior del cuerpo; las valvas I (cefálica), valvas II-VII (intermedias), la valva VIII (anal); y el cinturón o perinoto, que envuelve el cuerpo en toda su periferia.....11

Figura 2. *Acanthochitona noumeaensis* Leloup, 1941, imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM). Muestra los dientes de la rádula, de derecha a izquierda; (1) central, (2) menor lateral, (3) mayor lateral, (4) primer uncinal, (5) segundo uncinal, (6) mayor uncinal, (7) marginal interno, (8) marginal medio, (9) marginal externo (en Schwabe, 2010).....14

Figura 3. *Callistochiton elenensis*, se muestran los caracteres con valor taxonómico de las valvas; **Valva I** en vista dorsal; **ma**, margen anterior; **p**, pústula; **dmp**, dientes del margen posterior; **m**, muesca; **mp**, margen posterior; **c**, costilla. **Valva IV** en vista dorsal; **py**, placa yugal; **ma**, margen anterior; **ap**, área pleural; **ld**, línea diagonal; **c**, costilla; **p**, pústula; **mp**, margen posterior; **apc**, ápice; **dmp**, dientes del margen posterior; **ml**, margen lateral; **r**, reticulado; **a**, apófisis; **ay**, área yugal.....18

Figura 4. *Callistochiton elenensis*, **Valva IV** en vista ventral; **py**, placa yugal; **sy**, seno yugal; **rh**, radios de la hendidura; **ctv**, callo del tegumento ventral; **di**, diente de inserción; **hi**, hendidura de inserción; **a**, apófisis. **Valva VIII** en vista dorsal; **py**, placa yugal; **m**, mucro, **a**, apófisis; **r**, reticulado; **p**, pústula; **c**, costilla; **ap**, área postmucronal; **aa**, área anteromucronal.....18

Figure 5. *Stenoplax limaciformis*, **Valva I** en vista dorsal; **n**, nódulos (costillas entre cortadas en nódulos o reticulado); **mp**, margen posterior; **m**, muesca. **Valva IV** en vista dorsal; **ay**, área yugal; **a**, apófisis; **al**, áreas laterales; **mp**, margen posterior; **ld**, línea diagonal. **Valva IV** en vista ventral; **py**, placa yugal; **sy**, seno yugal; **t**, tegumento; **di**, diente de inserción; **ctv**, callo del tegumento ventral; **mp**, margen posterior; **hi**, hendiduras de inserción; **pr**, poros radiales; **a**, apófisis. **Valva VIII** en vista dorsal; **m**, mucro; **a**, apófisis; **aa**, área anteromucronal; **ap**, área postmucronal; **ce**, costillas entrecortadas; **cl**, costillas longitudinales.....19, 20

Figura 6. *Callistochiton* sp. **A**, vista dorsal de individuo de 8.2 mm de longitud, Parque de la Reina, Acapulco. **B** y **C**, vista dorsal y lateral de individuo de 8.7 mm de longitud, Ojo de Agua, Tecpan de Galeana. **D**, individuo en vista dorsal de 10.4 mm de longitud, Playa Troncones, La Unión. **E** y **F**, vista dorsal y lateral de individuo de 11.5 mm de longitud Playa Manzanillo, Acapulco. **G** y **H**, vista dorsal y lateral de individuo de 10.7 mm de longitud, Playa Tlacopanocha, Acapulco.....57

Figura 7. *Callistochiton* sp. **A**, vista dorsal y **B**, detalle de las valvas intermedias II–VI, individuo de 7.5 mm de longitud, Playa Manzanillo, Acapulco. **C**, vista dorsal y **D**, detalle de las valvas intermedias III–V, individuo de 98.2 mm de longitud, Playa Manzanillo. **E**, vista dorsal y **F**, vista lateral de individuo de 6.78 mm de longitud, Punta Mita, Nayarit.....58

Figura 8. *Callistochiton* sp. Imágenes de microscopía electrónica de barrido. **A**, vista dorsal de individuo de 10.8 mm de longitud, Playa Manzanillo, Acapulco. Individuo de 10.3 mm de longitud, Playa Troncones, La Unión, imagen de valva cefálica en vista dorsal, **B**; vista dorsal de la valva cefálica; **C** vista dorsal de la valva intermedia IV, **D**; detalle del área lateral de la valva IV, **E**; detalle de la escultura del área central de la valva IV, **F**; vista ventral de la valva intermedia IV.....59

Figura 9. *Callistochiton* sp. Imágenes de microscopía electrónica de barrido, individuo de 10.3 mm de longitud, Playa Troncones, La Unión. **A**, detalle de la placa de inserción de la valva IV en vista ventral; **B**, vista dorsal de la valva anal VIII; **C**, vista frontal de las

escamas de cinturón; D , detalle de la ornamentación de las escamas del cinturón; E , dientes de la rádula; F , detalle del diente central y menor lateral de la rádula.....	60
Figura 10. <i>Callistochiton elenensis</i> (Sowerby, 1832). A , B , vista dorsal y lateral de espécimen de 12.5 mm de longitud, Playa Las Gatas, Zihuatanejo. C , D , vista dorsal y lateral de individuo de 11.3 mm de longitud, Parque de la Reina Muelle, Acapulco. E , F , vista dorsal y lateral de individuo de 13.2 mm de longitud, Playa Tlacopanocha, Acapulco.....	61
Figura 11. <i>Callistochiton elenensis</i> (Sowerby, 1832). A , vista dorsal de individuo de 9.70 mm de longitud, Playa La Barrita, Petatlán; B , vista dorsal de individuo de 12.09 mm de longitud, Playa Manzanillo, Acapulco. Valvas desarticuladas en vista dorsal de individuo de 11.9 mm de longitud, Playa Majahua, Acapulco; C , valva cefálica, D , valva anal, E , valva intermedia IV.....	62
Figura 12. <i>Callistochiton elenensis</i> (Sowerby, 1832). Imágenes de microscopía electrónica de individuo de 10.7 mm de longitud, Playa Tlacopanocha, Acapulco; A , vista dorsal de la valva cefálica; B , vista dorsal de valva intermedia IV; C , vista ventral de la valva intermedia IV; D , vista dorsal de la valva anal VIII; E , detalle de la ornamentación de las escamas del cinturón; F , dientes de la rádula.....	63
Figura 13. <i>Callistochiton elenensis</i> (Sowerby, 1832), sintipo USNM 58865, individuo de 21 mm de longitud, localidad tipo Santa Elena, Panamá.....	64
Figura 14. <i>Callistochiton colimensis</i> (A. G. Smith, 1961), individuo de 10.5 mm de longitud, Punta Mita Nayarit, A en vista dorsal y B en vista lateral. Individuo de 12.74 mm de longitud, Punta Chile, Mazatlán, C en vista dorsal. <i>Callistochiton expressus</i> (Carpenter, 1865) individuo de 9.8 mm de longitud, La Unión Maculis, El Salvador CBUPRH2083, D en vista dorsal.....	65
Figura 15. <i>Callistochiton colimensis</i> (A. G. Smith, 1961). Individuo de 14.5 mm de longitud de Isla de la Piedra, Mazatlán, Sinaloa. A , valva cefálica en vista dorsal; B , valva intermedia IV en vista dorsal, muestra detalle de las áreas central y lateral; C , valva anal en vista dorsal; D , detalle de los estetos del áreas central de la valva intermedia IV; E , detalle	

de las escamas del cinturón, F , dientes de la rádula, muestra diente central y mayor lateral.....	66
Figura 16. <i>Callistochiton colimensis</i> (A.G. Smith, 1961), holotipo ANS 152139, individuo de 24.4 mm de longitud, localidad tipo Manzanillo, México.....	67
Figura 17. <i>Callistochiton expressus</i> (Carpenter, 1865), individuo de 9.8 mm de longitud, La Unión Maculis, El Salvador (CBUPRH2083). A , valva cefálica en vista dorsal; B , valva intermedia IV en vista dorsal; C , valva anal en vista dorsal; D , detalle de las escamas del cinturón, E , vista general de los dientes de la rádula; F , detalle del diente central y mayor lateral de la rádula.....	68
Figura 18. <i>Callistochiton expressus</i> (Carpenter, 1865), holotipo PRM370-38, individuo de 12 mm de longitud, localidad tipo Panamá.....	69
Figura 19. <i>Lepidozona serrata</i> (Carpenter, 1856). A , individuo de 8.90 mm de longitud en vista dorsal; La Paz, Baja California Sur; B , individuo de 7.8 mm de longitud en vista dorsal, La Paz, Baja California Sur. Individuo de 9.8 mm de longitud, Playa La Balandra, La Paz, Baja California Sur, C en vista dorsal y D en vista lateral.....	70
Figura 20. <i>Stenoplax</i> sp. A , individuo en vista dorsal de 9.7 mm de longitud, Barra de Potosí Expuesta, Petatlán; B , espécimen en vista dorsal de 8.7 mm de longitud, Punta Maldonado, Cuajinicuilapa; C , individuo en vista dorsal y D en vista lateral del individuo de 9.7 mm longitud, Playa Troncones, La Unión; E , individuo en vista dorsal de 9.1 mm de longitud, Playa La Barrita, Petatlán; F , individuo en vista dorsal de 8.9 mm de longitud, Playa Manzanillo, Acapulco; G , individuo en vista dorsal de 9.2 mm de longitud, Playa Majahua, Acapulco.....	71
Figura 21. <i>Stenoplax</i> sp. A , individuo en vista dorsal de 6.2 mm de longitud; B , individuo en vista dorsal de 5.7 mm de longitud, Playa Punta Maldonado, Cuajinicuilapa. Individuo de 5.2 mm de longitud, Playa La Barrita, Zihuatanejo de Azueta, en vista dorsal, C . Individuo de 7.3 mm de longitud, Playa La Barrita, Zihuatanejo de Azueta, en vista dorsal de D . Individuo de 10 mm de longitud, Playa Tlacopanocha, Acapulco en vista dorsal, E , y F , individuo de 11.5 mm de longitud en vista dorsal y lateral, Playa La Barrita, Zihuatanejo de Azueta.....	72

Figura 22. *Stenoplax* sp. Imágenes de microscopía electrónica de barrido; **A**, valva cefálica en vista dorsal, individuo de 10.1 mm de longitud; **B**, valva cefálica en vista dorsal de 6.5 mm de longitud. Valvas en vista dorsal de espécimen de 10.1 mm de longitud, Playa La Barrita, Zihuatanejo de Azueta; **C**, valva intermedia II en vista dorsal; **D**, valva intermedia III; **E**, valva intermedia IV y **F** valva intermedia V.....73

Figura 23. *Stenoplax* sp. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de individuo de 10.1 mm de longitud, Playa La Barrita, Zihuatanejo de Azueta; **A**, valva anal en vista dorsal; **B**, valva cefálica en vista ventral; **C**, valva intermedia IV en vista ventral, **D**, detalle de la placa de inserción de la valva intermedia IV en vista ventral, **E**, detalle del tegumento de la valva intermedia IV; **F**, detalle de los estetos de la valva IV.....74

Figura 24. *Stenoplax* sp. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de individuo de 10.1 mm de longitud, Playa La Barrita, Zihuatanejo de Azueta; **A**, valva anal en vista lateral y **B** en vista dorsal; **C**, escamas del cinturón en vista dorsal; **D**, dientes de la rádula; **E**, detalle del diente menor y mayor lateral.....75

Figura 25. *Stenoplax mariposa* (Bartsch MS. Dall, 1919). Individuo de 14 mm de longitud, Playa Balandra, La Paz, Baja California, Sur en vista dorsal **A** y **B** en vista lateral. **C**, Individuo de 8.4 mm de longitud, La Paz, Baja California Sur, en vista dorsal. **D**, vista dorsal de individuo de 13.7 mm de longitud de Playa El Saladito, Baja California Sur, **E**, detalle de la valva anal en vista lateral.....76

Figura 26. *Stenoplax mariposa* (Bartsch MS. Dall, 1919), Imágenes de microscopía electrónica, individuo de 15 mm de longitud, El Saladito, Baja California Sur; **A**, valva cefálica en vista dorsal; **B**, vista dorsal de la valva intermedia IV; **C**, vista ventral de la valva IV; **D**, vista dorsal de la valva anal; **E**, escamas del cinturón; **F**, dientes de la rádula; **G**, detalle del diente menor y mayor lateral.....77

Figura 27. Vista dorsal de *Stenoplax limaciformis* (Sowerby, 1832). **A**, individuo de 27.4 mm de longitud, Playa Majahua, Acapulco; **B**, individuo de 28.2 mm de longitud, Playa Troncones, La Unión; **C**, individuo de 30.8 mm de longitud, Playa La Angosta, Acapulco; **D**, espécimen de 31.4 mm de longitud, Playa Isla Grande, Zihuatanejo.....78

Figura 28. <i>Stenoplax limaciformis</i> (Sowerby, 1832), Imágenes de microscopía electrónica de barrido en vista dorsal de individuo de 27.8 mm de longitud, Playa Las Gatas, Zihuatanejo de Azueta; A valva cefálica; B , valva intermedia II; C , detalle del área lateral de la valva intermedia IV; D , detalle del área lateral de la valva intermedia V; E , superficie de las escamas del cinturón; F , detalle de los dientes de la rádula.....	79
Figura 29. <i>Stenoplax mariposa</i> (Dall, 1919), sintipo USNM58865, individuo de 16 mm de longitud, localidad tipo La Paz Baja California Sur.....	80
Figura 30. <i>Stenoplax rugulata</i> (Sowerby, 1832), lectotipo BMNH198028, individuo de 18.3 mm de longitud, localidad tipo Isla Lobos, Perú.....	81
Figura 31. Sitios de procedencia del material examinado de Guerrero, depositado en la Colección Nacional de Moluscos, (CNMO) IBUNAM.....	82
Figura 32. Sitio de muestreo de <i>Callistochiton colimensis</i> en la Isla de la Piedra, Mazatlán, Sinaloa.....	82
Figura 33. Sitio de procedencia del material examinado y analizado genéticamente de <i>Stenoplax mariposa</i> y <i>Lepidozona serrata</i> en Baja California Sur.....	83

CAPITULO 2

Figura 1. Árbol consenso del análisis de máxima verosimilitud con 1000 repeticiones de las secuencias del gen COI de las especies analizadas de los géneros <i>Callistochiton</i> y <i>Stenoplax</i> del Pacífico Oriental Tropical. El análisis incluye secuencias de especies pertenecientes a ambos géneros tomadas del Gen Bank, se indican por el número de acceso que inicia con letras mayúsculas seguidas por números (accession number).....	106
--	-----

LISTA DE CUADROS

CAPITULO 2

Cuadro 1. Muestra los valores de la lectura del ADN obtenido en la extracción con el kit QIAGEN. GE, corresponde al grupo externo.....	97
Cuadro 2. Muestra la secuencia del gen mitocondrial COI de las especies de quitones analizadas del Pacífico Oriental Tropical.....	102

Cuadro 3. Lista de especies incluidas en el análisis de las secuencias del gen COI tomadas del GenBank, incluyendo su número de acceso en la base de datos; se indica la región de procedencia y el estudio donde fue considerada la secuencia inicialmente.....	103
Cuadro 4. Comparación de similitud de las secuencias de <i>Callistochiton</i> sp. (1) y <i>Lepidozona serrata</i> (2), se indican los cambios en negritas y subrayados.....	105

LISTA DE APÉNDICES

CAPITULO 1

APÉNDICE A (Cuadros comparativos de caracteres morfológicos)

Cuadro 1. Caracteres de las valvas y de la escultura del tegumento de las especies del género <i>Callistochiton</i>	84
Cuadro 2. Caracteres del articulamento y los derivados del cinturón de las especies del género <i>Callistochiton</i>	85
Cuadro 3. Caracteres de las valvas y de la rádula del género <i>Stenoplax</i>	86
Cuadro 4. Caracteres del articulamento y de los derivados del cinturón del género <i>Stenoplax</i>	87
Cuadro 5. Distribución geográfica y caracteres externos del material tipo de las especies del género <i>Stenoplax</i>	88
Cuadro 6. Distribución geográfica y caracteres externos del material tipo de las especies del género <i>Callistochiton</i>	89

CAPITULO 2

APÉNDICE B (Protocolos de extracción)

1. Protocolo de Extracción de ADN técnica CTAB (Alonso-Domínguez, 2013).....	117
2. Protocolo de Extracción de ADN Kit Wizard Genomic DNA (Promega).....	118
3. Protocolo de Extracción de ADN Kit QIAGEN.....	119

Resumen

El estudio de la diversidad de la clase Polyplacophora en México se ha incrementado en la última década. En Guerrero se registraron 19 especies de quitones en el intermareal rocoso, de entre las cuales *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. se destacaron por sus atributos morfológicos. El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y genéticamente a *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp., así como a las especies que comparten su ámbito de distribución (*C. colimensis*, *C. expressus*, *C. elenensis*, *S. limaciformis*, *S. mariposa*). El análisis morfológico incluyó la descripción de las especies con énfasis en los caracteres de las valvas, elementos del cinturón y los dientes de la rádula. Estos caracteres se resumieron en cuadros comparativos e ilustraron con imágenes de microscopía de barrido; y se incluyeron comparaciones con material adicional depositado en colecciones científicas. La escultura del tegumento de *Callistochiton* sp. mostró mayores diferencias con *C. colimensis* y *C. elenensis*, que presentaron costillas más altas y desarrolladas, y con un patrón reticulado en las áreas centrales. *Callistochiton* sp. reveló escultura sub-reticulada en las áreas centrales, la cual fue muy similar a la observada en *C. expressus*. *Stenoplax* sp. mostró mayor diferencia con respecto a *S. limaciformis*, mientras que con *S. mariposa* fue similar en las escamas y los dientes de la rádula, sin embargo, *Stenoplax* sp. presentó sub-escultura presente únicamente en la periferia de las valvas, mientras que en *S. mariposa* la escultura es más desarrollada y se extiende en la totalidad del área de las valvas. El análisis genético se llevó a cabo con la secuencia del gen mitocondrial COI, con excepción de *C. colimensis*. El árbol filogenético mostró la pertenencia de las especies provisionales a los géneros *Callistochiton* y *Stenoplax*. Las especies del género *Lepidozona* (considerado en este estudio como grupo externo) se comportaron de diferentes formas, por ejemplo *L. mertensii* enraizó el árbol, mientras que *L. radians* se agrupó con el clado de *Stenoplax* y *L. serrata* se anidó con *Callistochiton*. El clado *Callistochiton* se conformó de dos grupos, el primero conformado por las especies con distribución en el Pacífico norte (*C. crassicosatus* y *C. palmulatus*) se agruparon con *C. elenensis*. El segundo grupo fue el de *Callistochiton* sp. y *L. serrata* que se conformaron como una misma especie y *C. expressus*

como su grupo hermano. La relación de *Callistochiton* sp. y *L. serrata* requiere de un estudio más profundo que permita establecer la identidad de *L. serrata*, mientras que *Callistochiton* sp. se comportó como una especie independiente al resto de las especies de su mismo género, corroborándose su estatus como una especie nueva para la ciencia. El clado de las especies del género *Stenoplax* mostró dos grupos, el conformado por *S. limaciformis* en el que el individuo de Guerrero presentó una mayor divergencia con respecto al de Costa Rica, y ambos se agruparon con *L. radians* que está relacionado con dichas especies pero más alejado filogenéticamente. *Stenoplax* sp. se comportó como una especie independiente a *S. mariposa* y a *S. limaciformis* y se considera una especie nueva para la ciencia; además, mostró mayor afinidad con *S. mariposa* con la que se relacionó como grupos hermanos. El estudio morfológico de las valvas, elementos del cinturón y dientes de la rádula y de la secuencia COI, permitió establecer a *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. de Guerrero como especies relacionadas con las especies analizadas del Pacífico Oriental Tropical, pero diferentes a ellas y se consideran especies nuevas para la ciencia.

Abstract

The study of the diversity of the Polyplacophora in Mexico has increased in the last decade. In Guerrero, 19 species of chitons were recorded in the rocky intertidal, *Callistochiton* sp. and *Stenoplax* sp. have distinct morphological attributes. The objective of this study was the morphological and genetic characterization of these two species, as well as to species that share their range of distribution (*C. colimensis*, *C. expressus*, *C. elenensis*, *S. limaciformis*, *S. mariposa*). The morphological analysis included the description of the species based on the characters of the valves, elements of the girdle and the radular teeth; these characters were summarized in comparative tables and were illustrated with scanning microscopy images. Additional specimens were examined from scientific collections. The

sculpture of the tegument of *Callistochiton* sp. showed more differences with *C. colimensis* and *C. elenensis*, in both species the ribs are more elevated and the central areas revealed a reticulated pattern. *Callistochiton* sp. revealed ribs with small pustules, except for those of the lateral and postmucronal area of the tail valve; and the central areas with sub-reticulate sculpture, very similar to those observed in *C. expressus*. *Stenoplax* sp. showed greater differences with *S. limaciformis*, whereas with *S. mariposa* was similar in the scales ornamentation and to the radular tooth; however, the sculpturing of *Stenoplax* sp. revealed a sub-culture only present on the periphery of the valves, whereas in *S. mariposa* it is more developed and it is extended throughout the entire area of the valves tegmentum. The genetic analysis was carried out with the sequence of the mitochondrial COI gene, with the exception of *C. colimensis*. The phylogenetic tree corroborated both species belonging to the genera *Callistochiton* and *Stenoplax*. However, the species of the genus *Lepidozona* (considered in this study as the external group) behaved in different ways; for example *L. mertensii* rooted the tree, while *L. radian* was grouped with *Stenoplax*, and *L. serrata* nested with *Callistochiton* sp. The *Callistochiton* clade consisted of two groups, the first comprise those species with distribution from the peninsula of Baja California to the North Pacific (*C. crassicostatus* and *C. palmulatus*) grouped with *C. elenensis*. The second group was *Callistochiton* sp. and *L. serrata* that conformed a single species with *C. expressus* as their sister group; this relationship between *Callistochiton* sp. and *L. serrata* requires a deeper study to establish the identity of *L. serrata*. The clade of *Stenoplax* showed two groups, the one conformed by *S. limaciformis* in which the individual from Guerrero presented a greater divergence with respect to the individual from Costa Rica. *Stenoplax* sp. nested with *S. mariposa* showing a relation of sibling groups. The study of the morphology and the COI sequence allowed to establish *Callistochiton* sp. and *Stenoplax* sp. from Guerrero as species related to the species analyzed of Tropical Eastern Pacific, but different to them and considered new to science.

Introducción General

Desde Linnaeus (1758), la sistemática de la clase Polyplacophora se ha basado en el establecimiento de afinidades morfológicas (Sirenko, 1993, 1997; Van Belle, 1983). Las primeras clasificaciones y descripciones de las especies del grupo fueron totalmente artificiales, ya que usaron exclusivamente caracteres de la escultura del tegumento y derivados del perinoto. Sin embargo, en la actualidad se ha identificado que dichos atributos son influenciados mayormente por el ambiente, ya que se ha observado el mismo tipo de escultura y elementos muy similares del cinturón en una variedad de géneros que pertenecen a diferentes categorías taxonómicas (orden y familia), como el resultado de posibles procesos de paralelismo y convergencia (Irisarri *et al.*, 2014). El uso excesivo de estos caracteres en la taxonomía de los quitones desde el siglo XVIII y hasta la mitad del XIX, generó la descripción de especies, géneros y familias nuevas, que en la actualidad se consideran sinonimias.

Esta problemática se observó en otros taxones por lo que desde los años 50's se iniciaron los análisis de las secuencias de proteínas, donde se detectaban cambios de los aminoácidos, con el objetivo de refinar las identificaciones taxonómicas. Sin embargo, los resultados de estos análisis representaban únicamente la traducción del genoma codificante (Trivedi *et al.*, 2016). Posteriormente se desarrollaron técnicas para detectar el grado de parentesco entre taxones, como las de inmunología por medio de la reacción cruzada (proporcional a la divergencia) y las de hibridación de ADN, sin embargo, resultaron ser poco fiables. La comparación de secuencias de ARNs y ADNs homólogos fue posible hasta el desarrollo de la PCR combinado con plataformas de análisis (Zhang y Hewitt, 2003; Dupont *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos autores han mencionado que las identificaciones de especies con base en secuencias no son confiables, ya que los marcadores moleculares solo reflejan una parte del genoma de las especies (Awise, 1994; Domínguez y Wheeler, 1997). Otros autores mencionan que es válido cuando la elección de

la región es correcta (informativa), así como la disponibilidad de datos (muestras, acervo) para la comparación (Steel y Penny, 2000). En la actualidad las secuencias del gen COI han sido eficaces para identificar a varios grupos de animales, y por ello son considerados marcadores útiles e informativos del código de barras de la vida (Paine *et al.*, 2007).

Los estudios que integran análisis de las secuencias de genes mitocondriales en quitones son escasos. Estos se han concentrado en clarificar y confirmar el estatus taxonómico de las categorías de orden y familias (Okusu, 2003; Kelly y Eernisse, 2008; García-Ríos *et al.*, 2014). Dichos estudios conjuntaron los atributos morfológicos y los análisis moleculares que además de refinar la sistemática del grupo, proporcionaron información para un mejor entendimiento de la biodiversidad de los quitones (Irisarri *et al.*, 2014). Recientemente, García-Ríos (2015) describió *Lepidochitona pseudoliozonis* para la región de Florida con base en la secuencia del gen COI de especímenes de Florida y Puerto Rico, anteriormente considerados como *L. liozonis* (Dall y Simpson, 1901).

Antecedentes

El género *Callistochiton* Dall, 1879 y *Stenoplax* Dall, 1879 han sido estudiados detalladamente en varias contribuciones del siglo XIX, principalmente por Ferreira (1979), Kaas y Van Belle (1994, 1987) y Bullock (1985), quienes describieron y esquematizaron (imágenes MEB y dibujos) las especies conocidas del Pacífico mexicano. Dichos autores, basaron sus estudios de las especies exclusivamente bajo criterios morfológicos. Aunque las técnicas de marcadores moleculares se encuentran bien desarrolladas, en la actualidad los estudios que incluyen a las secuencias de ADN son escasos, siendo los criterios morfológicos los que prevalecen en la distinción de especies. Recientemente García-Ríos *et al.* (2014) y García-Ríos (2015) incluyeron datos genéticos en sus contribuciones de carácter taxonómico, el primer estudio consistió en la calibración del reloj molecular de *Stenoplax limaciformis* (Sowerby, 1832), y el segundo, presenta la descripción de *Lepidochitona pseudoliozonis* García-Ríos, 2015 con base en evidencia molecular. Ambas

contribuciones proporcionaron información sobre la secuencia del gen COI de las especies estudiadas, que junto con las revisiones taxonómicas previas generaron información para un mejor entendimiento de las especies. La combinación de evidencias morfológicas y genéticas, ha sido empleada para resolver la problemática de la sistemática del grupo.

Estudios recientes sobre la composición de la Clase Polyplacophora de Guerrero han registrado 19 especies en el intermareal rocoso de distintas localidades (Flores-Garza *et al.*, 2012; Galeana-Rebolledo *et al.*, 2014). La examinación morfológica de la escultura de las valvas y de la ornamentación de las escamas del cinturón de estos materiales, reveló que *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. presentan caracteres distintivos de las valvas, los cuales no se habían registrado en las especies conocidas de la región. Ambas especies se consideraron como provisionales y posiblemente nuevas para la ciencia (Reyes-Gómez, 2016).

Clase Polyplacophora Gray, 1821

Etimología. Del griego *polýs* (πολύς) de varias o muchas; *plax* (πλαξ) de placa y *phorós* (φορός) de portador. Moluscos con una serie (ocho) de valvas (antes denominadas placas) dorsales.

Diagnosis

Hyman, 1967; Kaas y Van Belle, 1985a; Eernisse y Reynolds, 1994; Schwabe, 2010.

Moluscos dorso-ventralmente aplanados, simétricamente bilaterales; forma del cuerpo ovalada o alongada. Dorsalmente, el cuerpo está cubierto por ocho valvas traslapadas entre sí, que lateralmente se embeben al cinturón o perinoto (Figura 1). El perinoto es una estructura periférica al cuerpo, constituida de músculo y de prolongaciones del manto, está recubierto dorsal y ventralmente por una cutícula al que se segregan elementos calcáreos,

como escamas, espículas, espinas y cerdas córneas. Ventralmente, el pie ocupa la mayor cobertura del cuerpo; en la parte anterior se localiza la cabeza que es una estructura redondeada, poco desarrollada, sin ojos o tentáculos. La abertura en medio de la cabeza representa a la boca, y hacia el otro extremo del cuerpo se localiza una abertura o ano. En la abertura bucal se alberga la rádula, que es el órgano de trituración del alimento, y se organiza en un listón quitinoso ocupando casi 1/3 de la longitud total del quitón, con placas o dientes alineados en hileras. Los dientes por su morfología se dividen en ocho tipos, y se organizan en un arreglo horizontal y bilateral, repitiéndose en dirección antero-posterior. El diente mayor lateral, es el más elevado del resto de los dientes; apicalmente presenta un capuchón recubierto por magnetita orgánica, que le confiere una dureza similar al hierro y de color negro. Rodeando al pie, cabeza y ano, se encuentra el surco paleal, donde se albergan los ctenidios o branquias (con forma de plumas dobles), que por su disposición dentro del surco y la acción del agua que transporta, forman corriente inhalantes y exhalantes, permitiendo el intercambio de gases.

Distribución

Los quitones presentan un amplio rango batimétrico de distribución, en zonas rocosas o coralinas, en intermareal y submareal, hasta regiones abisales a 7000 m de profundidad (Schwabe, 2010). Las especies intermareales y del submareal somero son mejor conocidas que las de grandes profundidades. En comparación con otros grupos de moluscos la Clase Polyplacophora, representa un grupo pequeño, con alrededor de 940 especies vivientes (Schwabe, 2005). Esta clase se considera poco conocida a nivel global, ya que no han sido estudiados con la intensidad de otros grupos como las clases Gastropoda y Bivalvia; además existen áreas poco exploradas, como los sistemas insulares y arrecifales donde podría registrarse su presencia (Reyes-Gómez, 2016).

En México, se han registrado 102 especies distribuidas tan solo en el Pacífico Mexicano. De ellas 36 son consideradas raras o encuentran su límite de distribución en el Norte de

Baja California, ya que son más comunes al norte de la ecorregión denominada Ensenada del Sur de California (Southern California Bight), que comprende desde Santa Bárbara a San Diego. En el golfo de California habitan 19 especies conocidas únicamente en su localidad tipo y otras 10 que se extienden hasta el Pacífico Tropical Mexicano o a lo largo de la Provincia Panámica hasta Perú. La riqueza de especies se incrementa al sur del golfo de California y en todo el Pacífico Tropical Mexicano, donde suman alrededor de 46 y la mitad de ellas presenta un amplio rango de distribución hasta Ecuador y Perú. De las 28 familias conocidas globalmente para la Clase Polyplacophora, en México se encuentran ocho: Ferreiraellidae Dell'Angelo & Palazzi, 1991; Leptochitonidae Dall, 1889; Chaetopleuridae Plate, 1899; Ischnochitonidae Dall, 1889; Chitonidae Rafinesque, 1815; Acanthochitonidae Pilsbry, 1893; Lepidochitonidae Iredale, 1914 y Mopaliidae Dall, 1889. De las cuales Ischnochitonidae (5 géneros) y Lepidochitonidae (3 géneros), son las mejor representadas en el Pacífico Mexicano, con 51 y 10 especies respectivamente (Reyes-Gómez, 2016).

Caracteres morfológicos usados en la taxonomía de la Clase Polyplacophora

Caracteres externos

La Clase Polyplacophora es un linaje antiguo del Phylum Mollusca, de acuerdo al registro fósil data del Cámbrico tardío hace unos 430 millones de años (Vendrasco *et al.*, 2012; Irrisari *et al.*, 2014). Los miembros de esta clase son conocidos comúnmente como quitones; de manera particular en México se les denomina “cucarachas de mar”, y en zonas como Oaxaca son conocidos también como “lenguas de perro” (Reyes-Gómez y Salcedo-Vargas, 2002; Reyes-Gómez, 2004). Pueden variar de tamaño desde varios milímetros hasta aproximadamente 10 centímetros de longitud; aunque *Cryptochiton stelleri* (Middendorff, 1847) del Pacífico Norte alcanza una longitud de 33–36 cm y una longevidad de 17 a 40 años (Lord, 2012). Sin embargo, la mayoría de las especies oscilan entre los 8 mm y 4–5 cm de longitud del cuerpo, y se estima que viven alrededor de 4 años (Hyman, 1967).

Son organismos exclusivamente marinos, y se caracterizan por presentar cuerpo aplanado y ocho valvas dorsales (Figura 1). Las valvas, presentan morfología y estructuras diferentes a la concha de otros grupos de moluscos, debido a la presencia de un tegumento característico de los quitones. Las valvas están constituidas por tres capas, el periostraco es la más externa, fina y transparente, la cual recubre dorsalmente al tegumento. La segunda capa o tegumento está constituida de material orgánico e inorgánico; es la capa más gruesa que además desarrolla la escultura (ornamentación) de las valvas, y que concentra la pigmentación. El material orgánico del tegumento está constituido de una red de filamentos ramificados, que son finas prolongaciones del manto, las cuales se extienden hasta la superficie dorsal de las valvas, generando formaciones circulares denominadas estetos (Eernisse y Reynolds, 1994). La función de los estetos no está totalmente establecida, aunque se han identificado sus propiedades foto-receptoras; también se ha sugerido que sean mecano y quimiorreceptores; sin embargo, no hay evidencia de que secreten sustancias para alguna función específica. Los estetos se distribuyen a través de un sistema de canales, que se embebe en el tegumento y que constituye el material inorgánico de este tegumento. Estos canales, se forman de una matriz de carbonato de calcio, que generalmente se concentra lateralmente y con menor densidad en el centro de las valvas, elevando y deprimiendo dichas regiones, las cuales desarrollan diferentes tipos de ornamentación o escultura que se desarrolla dorsalmente (Hyman, 1967). La tercera capa que se encuentra por debajo del tegumento, se denomina articulamento, y tiene consistencia casi inorgánica y fuertemente compactada de cristales de carbonato de calcio. El articulamento, se proyecta y desarrolla lateralmente hacia ambos lados y en la parte anterior de las valvas forma la placa de inserción, que en los quitones vivos se encuentra seccionada formando dientes que se anclan en el cinturón. Las proyecciones anteriores del articulamento forman la lámina sutural o apófisis, que se inserta en los músculos dorsales por debajo de la valva subsecuente (Schwabe, 2010).

El cinturón o perinoto, es una prolongación del manto que secreta elementos calcáreos, quitinosos o córneos. La epidermis del cinturón está conformada de células alargadas,

separadas entre sí, que se agrupan formando conglomerados, denominados papilas. Estas son paquetes celulares que secretan estructuras complejas como escamas, espículas, pelos o espinas. Las papilas son más abundantes en la superficie dorsal del cinturón que en su parte ventral, donde las escamas son generalmente aplanadas y delgadas. Ventralmente, se localiza el surco paleal rodeando al pie y a la cabeza, y alberga lateralmente una hilera de ctenidios o branquias a cada lado; el número de ctenidios puede ir de 6 a 88 pares, el cual no es constante en las especies y puede variar. La distribución de los ctenidios puede ser continua o regionalizada, y está ligada a la evolución de los dos linajes principales de la Clase Polyplacophora: órdenes Lepidopleurida y Chitonida (Eernisse y Reynolds, 1994). Las valvas por su morfología se dividen en tres, la valva más anterior se denomina cefálica (valva I) y se encuentra dorsalmente opuesta a la cabeza. Esta estructura carece de lámina sutural, aunque la placa de inserción está bien desarrollada a lo largo de toda su periferia circular. Las valvas contiguas o intermedias (valvas II–VII), presentan la misma estructura, aunque su ancho y grosor puede variar. Las valvas intermedias desarrollan una lámina sutural anterior, denominadas apófisis que generalmente son de forma semi triangular o rectangulares, mientras que la placa de inserción puede variar en longitud y los dientes de inserción pueden ser lisos o serrados dependiendo la categoría taxonómica (orden o familia) a la que pertenezcan. Dorsalmente las valvas intermedias presentan una regionalización, dada por el tipo de escultura (ornamentación) y el relieve que se forma es producto de la concentración del tegumento. Las áreas laterales se desarrollan en forma de triángulo (lateral), generalmente elevado a cada lado de las valvas, y el triángulo de la parte media, se denomina área central; ambas regiones desarrollan escultura diferente, y en las áreas laterales coincide con el tipo de escultura de la valva cefálica. La valva más posterior o anal (VIII) se localiza dorsalmente contraria a la apertura anal. Dorsalmente se encuentra dividida en dos regiones con respecto a la posición del mucro; el área anteromucronal, que presenta el mismo tipo de escultura que las áreas centrales, y el área postmucronal, que desarrolla la misma escultura que la valva cefálica y las áreas laterales.

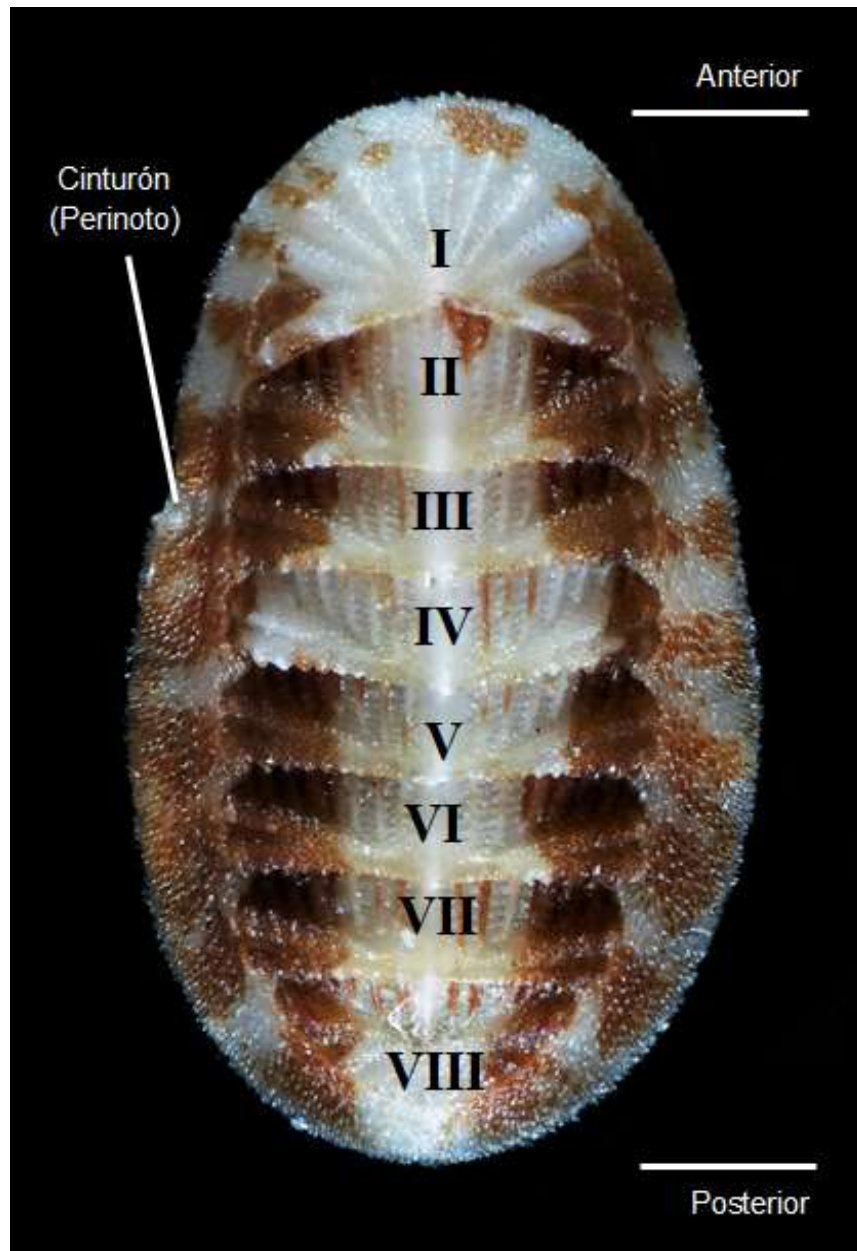


Figura 1. *Callistochiton expressus* (Carpenter, 1865), individuo de 9.8 mm de longitud, La Unión Maculis, El Salvador, CBUPRH2083. Se muestra la forma dorso-ventralmente aplanada del cuerpo de los quitones; el plano anterior y posterior del cuerpo; las valvas I (cefálica), valvas II–VII (intermedias), la valva VIII (anal); y el cinturón o perinoto, que envuelve el cuerpo en toda su periferia.

Escultura del tegumento

El tipo de escultura del tegumento u ornamentación de las valvas, caracteriza y define a sus miembros a nivel de familia, género y especie. Usualmente las valvas presentan una escultura desarrollada a diferentes niveles y pueden incluir variaciones en su ornamentación (excepto la valva cefálica). La escultura de la valva cefálica, generalmente presenta un arreglo radial o dirigido concéntricamente con respecto al ápice, independientemente del tipo de escultura que presente (Kaas y Van Belle, 1985a). Hacia la periferia es más desarrollada o acentuada, mientras que al aproximarse al ápice se atenúa, y puede desaparecer. La escultura de las valvas intermedias, se compone de dos tipos: 1) la que se desarrolla en las áreas laterales, y que es idéntica a la de la valva cefálica, e igualmente con arreglo radial con respecto al ápice (usualmente, la transición entre las áreas laterales y el área central puede desarrollar deformación de la escultura, aunque en algunas especies es continua sin interrupción, como en *Stenoplax boogii* Haddon, 1886; 2) la escultura (ornamentación) del área central, la cual ocupa la mayor área de la valva y puede incluir al área yugal, aunque generalmente el yugum es liso o con escultura reminiscente; usualmente en ésta área la escultura presenta un arreglo longitudinal. El área anteromucronal de la valva anal, presenta la misma conformación del área central de las valvas intermedias, con la distinción de que el ápice se eleva, moderada o conspicuamente, indicando el mucro. La región contigua corresponde al área postmucronal, con forma de media luna y con la misma escultura del tegumento presente en la valva cefálica y las áreas laterales y con dirección concéntrica o radial con respecto al mucro (Hyman, 1967).

Características internas con importancia taxonómica

La musculatura de los quitones es sofisticada, aunque no tiene relevancia en su taxonomía, se menciona su singularidad por su importancia en las hipótesis filogenéticas del grupo. Su sistema muscular les permite enrollarse en sí mismos, como una respuesta de protección, envolviendo y resguardando sus partes blandas y exponiendo las placas (Kaas y Van Belle,

1985a). Las valvas están unidas por cuatro pares de músculos; los músculos rectos son dos grupos de finas fibras paralelas entre sí y organizadas desde el margen anterior que se desarrollan por debajo de la valva cefálica, y a lo largo de las valvas intermedias y hasta la parte posterior, terminando en la valva anal. Estas fibras, se localizan a la altura del seno yugal, y se dirigen paralelas justo por debajo del yugum, donde se insertan al cuerpo y a la valva. Los músculos oblicuos, se originan en el seno yugal, a la derecha e izquierda de los músculos rectos formando un ángulo de 45°; se extienden longitudinalmente por debajo del borde diagonal de las áreas laterales y hasta la valva contigua. Los músculos transversales, mantienen a las valvas en posición horizontal, y consisten en fibras dorso-ventrales adheridas a su margen posterior y a las apófisis de la siguiente valva. Los márgenes laterales de las valvas, se conectan con el pie por medio de dos grupos de músculos denominados laterales posteriores y anteriores (Hyman, 1967). La boca se encuentra ventralmente en el centro de la cabeza, abriéndose hacia la cavidad bucal, donde se forma un saco ciego por debajo del órgano sub-radular, con una posible función gustativa. Posterior a la cavidad bucal, se localizan las glándulas de salivales, que secretan grandes cantidades de mucus, y aunque su función no es clara, se ha sugerido que permiten humectar el alimento que circula y que generalmente contiene grandes cantidades de minerales duros (e.g. roca, sedimentos, diatomeas). Además, esta región desarrolla una fuerte pared muscular, reforzada con quitina, que en su conjunto desarrolla una estructura firme que funciona como la capa inferior de la rádula (Kaas y Van Belle, 1985a).

La rádula, se encuentra en la base de la cavidad bucal, y está conformada por un listón quitinoso en el que se insertan filas transversales de dientes o placas que presentan una morfología distintiva. El aparato radular funciona por medio de un complejo sistema muscular, permitiéndole efectuar movimientos hacia adentro y hacia afuera, y realizar el raspado de las superficies. Cuenta con 17 dientes organizados en filas transversales, insertados sobre el listón de quitina. La morfología de ciertos dientes es de interés para la identificación taxonómica de las especies, aunque se puede observar también homogeneidad en los dientes de la rádula a nivel de género (e.g. *Stenoplax*, *Chiton*) (Saito,

2004). Morfológicamente, se identifican nueve dientes (placas), que organizados de afuera hacia adentro pueden identificarse en nueve tipos distintos (Figura 2) (Schwabe, 2010).

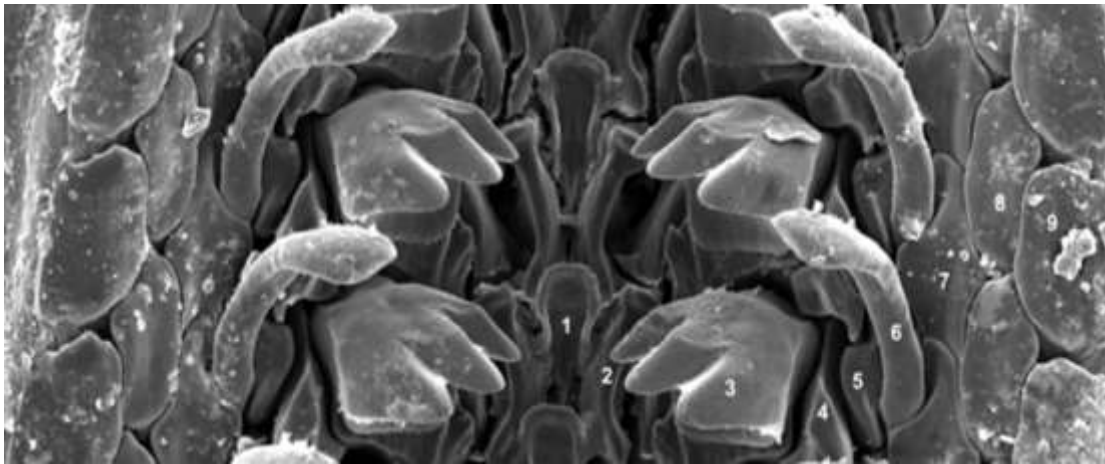


Figura 2. *Acanthochitona noumeaensis* Leloup, 1941, imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM). Muestra los dientes de la rádula, de derecha a izquierda; (1) central, (2) menor lateral, (3) mayor lateral, (4) primer uncinal, (5) segundo uncinal, (6) mayor uncinal, (7) marginal interno, (8) marginal medio, (9) marginal externo (véase Schwabe, 2010).

El estudio de la rádula de los poliplacóforos se ha enfocado en los dientes central, menor y mayor lateral, ya que presentan una amplia variabilidad morfológica por lo que son de interés taxonómico (Sirenko, 2006). El diente central, es una placa alargada, sub-rectangular o sub-cuadrada, con o sin doblez apical. El diente menor lateral, consiste de dos piezas, una que rodea al diente central y otra que consiste en una placa que se extiende entre el diente central y el mayor lateral. El diente mayor lateral, es la unidad raspadora más importante y activa de la rádula; consiste de una formación apical mineralizada de magnetita orgánica y se le conoce como el capuchón denticular, que puede ser unicúspide, bicúspide o tricúspide, dependiendo de la categoría taxonómica a la que pertenezca (Hyman, 1967). El resto de los dientes de la rádula (sin valor taxonómico) representan

placas que pueden variar en grosor o longitud, pero que en general mantienen su forma. Los dientes uncinales se mantienen en su sitio y se mueven gracias al movimiento y la depresión que el diente mayor lateral desarrolla en su parte posterior externa. El diente uncinial es una placa en forma de tallo, alargada y con un ápice anterior en forma de espátula. Los dientes marginales externos y medios externos son placas aplanadas, subrectangulares, con su parte apical ligeramente alargada (Saito, 2004; Sirenko, 2006).

Entre los especialistas de la Clase Polyplacophora, no existe un consenso en el valor taxonómico de la morfología de los dientes de la rádula. Por un lado, la mayoría se inclina por describir los dientes como parte accesoria de las especies, y sólo en algunos casos los consideran como un carácter distintivo entre ellas (Eernisse *et al.*, 2007). Un grupo pequeño de autores considera que hay evidencia en la prolongación petaloide de los dientes laterales mayor y menor, que definen a las especies y que además permiten proponer hipótesis filogenéticas en categorías taxonómicas superiores como de orden y familia (Saito, 2004). Hasta el momento se cuenta con información poco conclusiva para considerar la morfología de los dientes de la rádula como un carácter distintivo entre taxones. Sin embargo, en las descripciones de las especies se menciona la morfología del capuchón denticular y del diente central.

Sistemática de la Clase Polyplacophora

Linnaeus (1758), describió las primeras cuatro especies de quitones y el género *Chiton* para clasificarlas. Posteriormente Pilsbry (1892-1894) y Thiele (1909-1910), propusieron las primeras clasificaciones para las especies conocidas hasta entonces. Recientemente estas clasificaciones se han revisado a detalle por Van Belle (1983), y en las monografías de Kaas y Van Belle (1985a, 1985b, 1987, 1990 y 1994).

El origen del linaje de los quitones ha sido debatido y estudiado por varios investigadores. El registro fósil revela que están bien representados en el Ordovícico temprano, aunque es

dudosa su presencia en el Cámbrico. Se propuso que *Matthevia* Walcott, 1885 y *Chelodes* Davidson y King, 1874 del Cámbrico tardío, presentaban similitudes con los quitones (Eernisse y Reynolds, 1994); sin embargo, no es claro el estatus de dichos taxones ni su relación con la Clase Polyplacophora. En la actualidad se conocen 300 especies fósiles, la mayoría, descritas a partir de valvas desarticuladas. En el siglo pasado y hasta la clasificación de Sirenko (1993, 1997, 2006), las especies vivientes se incluyeron en el orden Neoloricata que posteriormente se clasificó en el orden Lepidopleurida Thiele, 1910 y Chitonida Thiele, 1910, basándose en la posición de los ctenidios con respecto al nefridioporo, el tipo del desarrollo del articulamento y la ornamentación de los óvulos y espermatozoides. Dicha clasificación ha sido corroborada recientemente con análisis de ADN (Irisarri *et al.*, 2014). Dentro de la Clase Polyplacophora, se distinguen los quitones más comunes de las familias Ischnochitonidae Dall, 1889, Chitonidae Rafinesque, 1815, Acanthochitonidae Pilsbry, 1893, y Mopaliidae Dall, 1889.

Los quitones, a diferencia de los otros grupos de moluscos presentan ocho grupos de bandas musculares localizadas dorsalmente y que son puntos de fuerte adhesión de las valvas al cuerpo. Estos elementos musculares, son muy similares a los presentes en los Monoplacophora. Wingstrand (1985) fue el primero que observó estas similitudes y propuso que la Clase Polyplacophora y los Conchifera derivaron del mismo ancestro. Además, consideró que los antecesores de ambos grupos presentaban ocho secciones o series de placas, que representan estructuras repetidas que conformaban la concha, y que eventualmente se diferenciaron y desarrollaron; éste tema todavía continúa en debate (Eernisse y Reynolds, 1994). Los estudios filogenéticos, han demostrado que la Clase Polyplacophora se divide en dos grandes grupos clasificados en dos órdenes, Lepidopleurida y Chitonida Thiele, 1910 (Irisarri *et al.*, 2014). Chitonida, incluye a la mayoría de los quitones vivientes, y con bases morfológicas y moleculares, se definen dos linajes agrupados en dos subórdenes: 1) Chitonina Thiele, 1910, caracterizado por la presencia de ctenidios adanales con prolongaciones delgadas en la cubierta de los ovocitos de las hembras; y 2) Acanthochitonina Bergenhayn, 1930, con ctenidios abanales y

prolongaciones en forma de cono en la cubierta de los ovocitos (Sirenko, 2006). Las categorías inferiores a suborden (Familia y Género) han sido objeto de estudio mediante análisis moleculares y aunque se han aclarado varios grupos, aún hay otros que no están bien definidos (i.e. *Nutallina*, *Lepidochitona*, *Cyanoplax*). Una de las aportaciones más importantes de los estudios moleculares en la sistemática del grupo es que han confirmado que la información de los caracteres morfológicos, son consistentes y permiten también clasificar naturalmente a las especies (Okusu *et al.*, 2003; Irisarri *et al.*, 2014).

Familia Ischnochitonidae, Dall 1889

Diagnosis

Quitones con placa de inserción en la valva cefálica y anal con múltiples hendiduras; las valvas intermedias presentan de una a más hendiduras; los dientes de inserción son lisos (Kaas y Van Belle, 1985b).

Género *Callistochiton* Dall, 1879

Diagnosis

Individuos relativamente pequeños, la escultura del tegumento con costillas granosas (pústulas redondeadas) de apariencia ondulada; áreas laterales generalmente con dos costillas radiales y con reticulado en las áreas centrales: escamas del cinturón con una superficie u ornamentación de costillas (Figura 3, 4) (Ferreira, 1979; Kaas y Van Belle, 1994).

Distribución

El género *Callistochiton* presenta una distribución global, y particularmente bien representado en el Pacífico norte con la mayoría de las especies reconocidas del género (10 de 18 especies), que encuentran su límite sur en el norte de Baja California. Las especies tropicales son tres, y se distribuyen desde La Paz, Baja California Sur: *Callistochiton elenensis* (Sowerby en Broderip y Sowerby, 1832); desde Mazatlán y a lo largo del Pacífico Tropical Mexicano: *Callistochiton colimensis* (A.G. Smith, 1961), y hasta Panamá: *Callistochiton expressus* (Carpenter, 1865) (Ferreira, 1979).

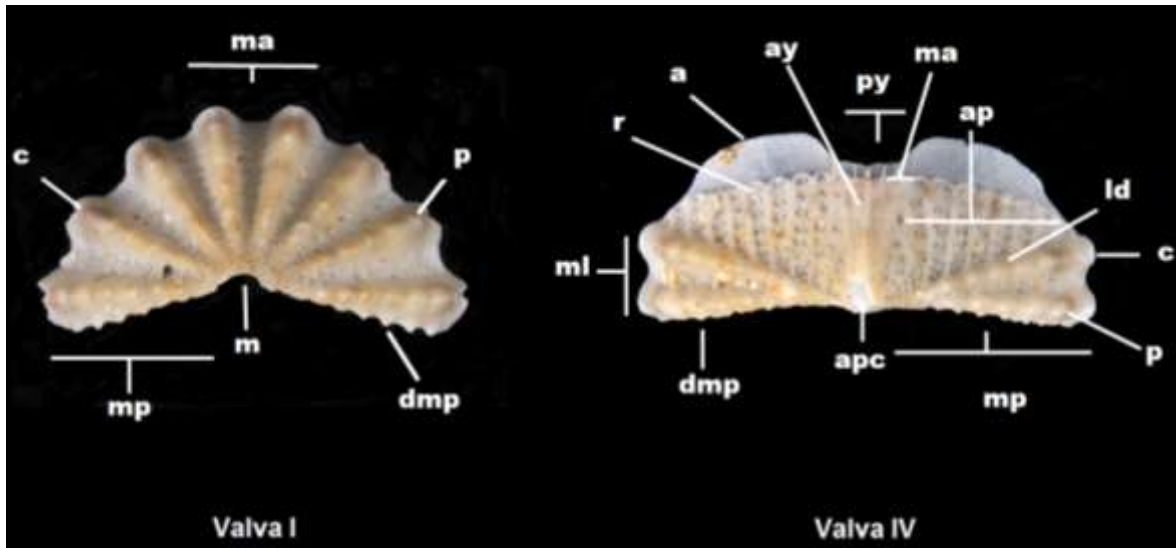


Figura 3. *Callistochiton elenensis*, se muestran los caracteres con valor taxonómico de las valvas; **Valva I** en vista dorsal; **ma**, margen anterior; **p**, pústula; **dmp**, dientes del margen posterior; **m**, muesca; **mp**, margen posterior; **c**, costilla. **Valva IV** en vista dorsal; **py**, placa yugal; **ma**, margen anterior; **ap**, área pleural; **ld**, línea diagonal; **c**, costilla; **p**, pústula; **mp**, margen posterior; **apc**, ápice; **dmp**, dientes del margen posterior; **ml**, margen lateral; **r**, reticulado; **a**, apófisis; **ay**, área yugal.

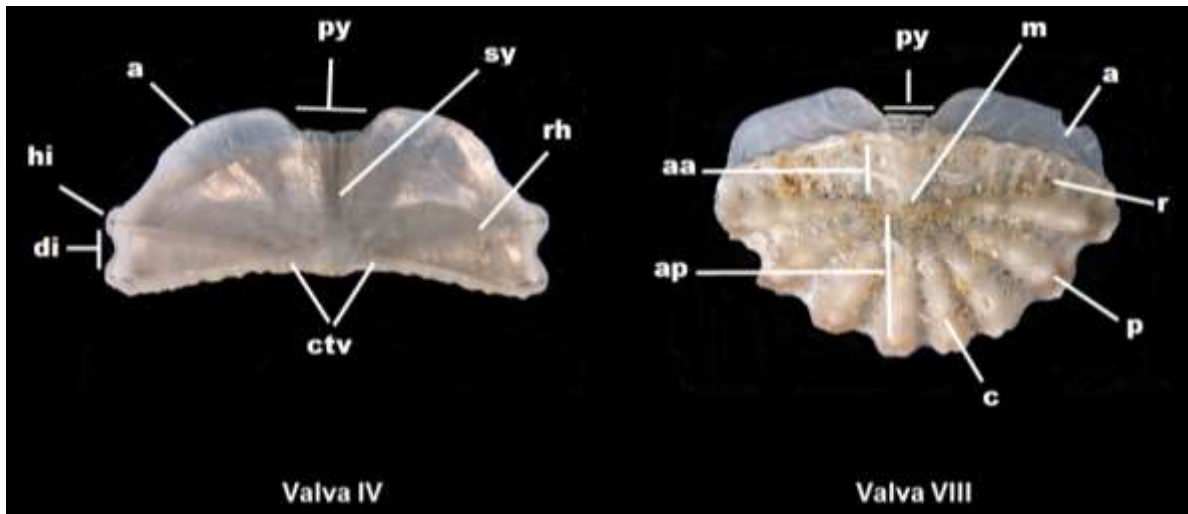


Figura 4. *Callistochiton elenensis*, **Valva IV** en vista ventral; **py**, placa yugal; **sy**, seno yugal; **rh**, radios de la hendidura; **ctv**, callo del tegumento ventral; **di**, diente de inserción; **hi**, hendidura de inserción; **a**, apófisis. **Valva VIII** en vista dorsal; **py**, placa yugal; **m**, mucro, **a**, apófisis; **r**, reticulado; **p**, pústula; **c**, costilla; **ap**, área postmucronal; **aa**, área anteromucronal.

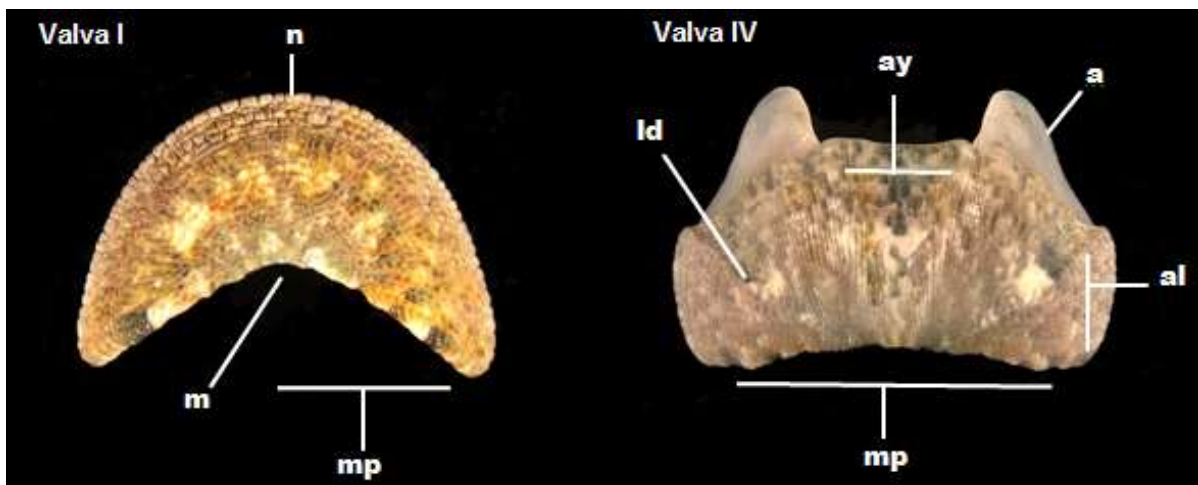
Género *Stenoplax* (Carpenter MS) Dall, 1879

Diagnosis

Quitones alargados, generalmente de tallas medianas y hasta 50 mm; color variable, principalmente verde olivo, rosa, crema, café, amarillo, anaranjado; escultura del tegumento de la valva cefálica y el área postmucronal de la valva anal con costillas entrecortadas, formando retículos o nódulos; áreas centrales y área anteromucronal de la valva anal, con costillas longitudinales. Mucro medio o ligeramente post-medio; escamas del cinturón pequeñas y alargadas, con una superficie de costillas; diente mayor lateral con capuchón denticular tricúspide (Figura 5) (Bullock, 1985).

Distribución

Las especies de éste género tienen distribución global, se encuentran en ambos lados del Océano Pacífico, India y el Atlántico. En el golfo de California y en la costa oeste de la península de Baja California, está representado por cuatro especies (*S. conspicua*, *S. magdalensis*, *S. mariposa* y *S. sonora*). En el Pacífico Tropical Mexicano se conoce *S. limaciformis*, especie con amplio rango de distribución, desde Mazatlán hasta Perú.



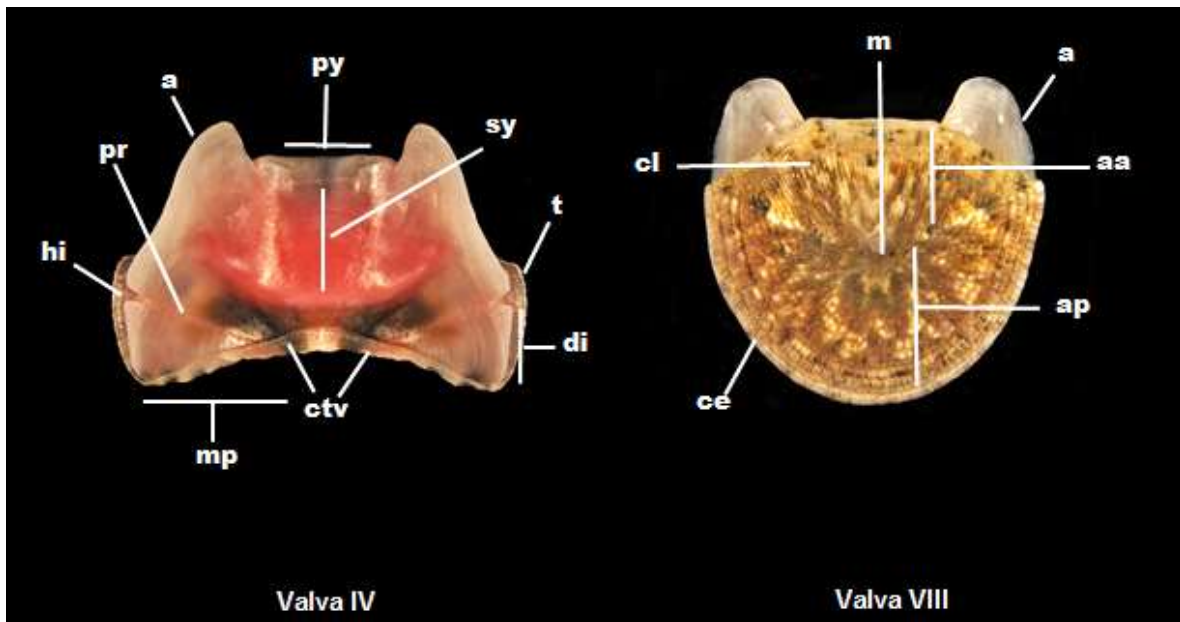


Figura 5. *Stenoplax limaciformis*, **Valva I** en vista dorsal; **n**, nódulos (costillas entre cortadas en nódulos o reticulado); **mp**, margen posterior; **m**, muesca. **Valva IV** en vista dorsal; **ay**, área yugal; **a**, apófisis; **al**, áreas laterales; **mp**, margen posterior; **ld**, línea diagonal. **Valva IV** en vista ventral; **py**, placa yugal; **sy**, seno yugal; **t**, tegumento; **di**, diente de inserción; **ctv**, callo del tegumento ventral; **mp**, margen posterior; **hi**, hendiduras de inserción; **pr**, poros radiales; **a**, apófisis. **Valva VIII** en vista dorsal; **m**, mucro; **a**, apófisis; **aa**, área anteromucronal; **ap**, área postmucronal; **ce**, costillas entrecortadas; **cl**, costillas longitudinales.

Objetivo General

Caracterizar morfológica y genéticamente a las especies provisionales de Guerrero *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp.

Objetivos particulares

1. Describir y comparar la microestructura de las valvas, escamas del cinturón y los dientes de la rádula de las especies de los géneros *Callistochiton* y *Stenoplax* presentes en el Pacífico Mexicano.
2. Obtener la secuencia del gen mitocondrial COI, de las especies estudiadas y realizar un análisis comparativo entre ellas.
3. Conjuntar la información morfológica y genética para establecer la identidad de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp.

Hipótesis

Los atributos morfológicos de la ornamentación de las escamas del cinturón de *Callistochiton* sp. y de la sub-escultura de las costillas de *Stenoplax* sp., las distinguirán del resto de las especies estudiadas del Pacífico Oriental Tropical. El estudio del gen mitocondrial COI de las especies, confirmará a *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. como especies nuevas para la ciencia.

Logística experimental

Para el estudio morfológico se usaron las técnicas de fotografía multifocal y de microscopía de barrido, que permitieron obtener una mayor magnificación para reconocer y describir los atributos de las estructuras, así como contar con evidencia gráfica de lo observado. Para la caracterización genética se utilizó la secuencia del gen mitocondrial COI (también conocido como código de barras) ya que en los taxones animales ha mostrado su utilidad y fidelidad en la distinción de especies.

Referencias

- Avise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, 361 p.
- Bullock, R. C. 1985. The *Stenoplax limaciformis* (Sowerby, 1832), species complex in the New World (Mollusca: Polyplacophora: Ischnochitonidae). *The Veliger*, 27(3): 291-307.
- Dominguez, E. y Q. D. Wheeler. 1997. Taxonomic stability is Ignorance: A critique of “Phylogenetic” Nomenclature. *Cladistics*, 13: 367-372.
- Dupont, S., K. Wilson, MObst, M., H. Skold, H. Nakamo y M. C. Thorndyke. 2007. Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. *Marine Ecology Progress Series*, 332: 257–273.
- Eernisse, D. J. y P. D. Reynolds. 1994. Polyplacophora. In: Harrison F. W, Kohn A J, editors. *Microscopic anatomy of invertebrates, Volume 5, Mollusca 1*. New York (NY): Wiley- Liss; p. 56–110.
- Eernisse, D. J., R. N. Clark y A. Draeger. 2007. Polyplacophora. Pp. 701-713, in: J. T. Carlton (ed.), *Light and Smith Manual: The Intertidal Invertebrates of Central California to Oregon, 4th Edition*. University of California Press, Berkeley, CA.
- Ferreira, A. J. 1979. The genus *Callistochiton* Dall, 1879 (Mollusca: Polyplacophora) in the eastern Pacific, with the description of a new species. *The Veliger*, 21(4): 444- 466.
- Flores-Garza, R., L. Galeana-Rebolledo, A. Reyes-Gómez, S. García Ibáñez, C. Torreblanca-Ramírez, P. Flores-Rodríguez y A. Valdés González. 2012. Polyplacophora species richness, composition and distribution of its community associated with the intertidal rocky substrate in the marine priority region No. 32 in Guerrero, Mexico. *Open Journal of Ecology*, 2(4): 192-201.
- Galeana-Rebolledo, L., R. Flores-Garza, A. Reyes-Gómez, S. García-Ibáñez, P. Flores-Rodríguez, C. Torreblanca-Ramírez y A. Valdés-González. 2014. Species richness and community structure of Class Polyplacophora at the intertidal rocky shore on the marine priority region no. 33, México. *Open Journal of Ecology*, 4(2): 43-52.

- García-Ríos, C., N. Pérez-Pérez; J. Fernández-López y F. Fuentes. 2014. Calibrating the chitons (Mollusca: Polyplacophora) molecular clock with the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase I gene. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49: 193-207.
- Hyman, L. H. 1967. *The invertebrates*, Vol. 6, Mollusca I. New York, McGraw Hill Book Co., 550 p.
- Irisarri I., D. Eernisse y R. Zardoya. 2014. Molecular phylogeny of Acanthochitonina (Mollusca: Polyplacophora: Chitonida): three new mitochondrial genomes, rearranged gene orders and systematics, *Journal of Natural History*, DOI:10.1080/00222933.2014.963721.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1985a. *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*. Vol. 1. Order Neoloricata: Lepidopleurina. 240 pp., 95 figs., 45 maps. E.J. Brill Backhuys, Leiden. Publisher.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1985b. *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*. Vol. 2. Suborder Ischnochitonina. Ischnochitonidae. Schizoplacinae, Callochitoninae and Lepidochitoninae. 198 pp., 76 figs., 45 maps. E.j. Brill Backhuys, Leiden. Publisher.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1987. *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*. Vol. 3. Suborder Ischnochitonidae. Chaetopleurinae and Ischnochitoninae. Addition to vols. 1 and 2. E.J. Brill Backhuys, Leiden, 301 p.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1990. *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*. Vol. 4. Suborder Ischnochitonina: Ischnochitonidae: Ischnochitoninae. (cont.). Addition to vols. 1, 2 and 3. E.J. Brill Backhuys, Leiden, 298 p.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1994. *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*. Vol. 5. Suborder Ischnochitonina: Ischnochitonidae: Ischnochitoninae (concluded); *Callistoplacinae*; *Mopaliidae*. Addition to vols. 1-4, E.J. Brill Backhuys, Leiden, 402 p.

- Kelly, R. P. y D. J., Eernisse. 2008. Reconstructing a radiation: the chiton genus *Mopalia* in the north Pacific. *Invertebrate Systematics*, 22: 17-28.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae, Regnum Animale*, ed 10, Vol. I, Vermes, Testacea, Chiton. P. 667. [Photographic facsímile, British Museum of Natural History, 1956.].
- Lord, P. J. 2012. Longevity and Growth Rates of the Gumboot Chiton, *Cryptochiton stelleri*, and the black leather chiton, *Katharina tunicate*. *Malacologia* 55(1): 43-54. doi:<http://dx.doi.org/10.4002/040.055.0104>
- Okusu, A., E. Schwabe, D. J. Eernisse y G. Giribet. 2003. Towards a phylogeny of chitons (Mollusca: Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(4): 281-302.
- Paine, M., J. McDowell y J. Graves. 2007. Specific identification of Western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bulletin of Marine Science*, 80(2): 353-367.
- Pilsbry, H. A. 1892–1894. Monograph of the Polyplacophora. In: Tryon G. W Jr, editor. *Manual of Conchology*. Vol. 14 (1892): p. 1–128; Vol. 14 (1893): p. 129–350; Vol. 15 (1893): p. 1–64; Vol. 15 (1894): p. 65–133. Philadelphia (PA): Academy of Natural Sciences.
- Reyes-Gómez, A. y M. A. Salcedo-Vargas. 2002. The Recent Mexican chiton (Mollusca: Polyplacophora) species. *The Festivus, San Diego California* 34(2): 17-27.
- Reyes-Gómez, A. 2004. Chitons in Mexican Waters. *Bolletino Malacologico, Suppl.* 5: 69-82.
- Reyes-Gómez, A. 2016. The Polyplacophora from the Mexican Pacific. *Supplement to The Festivus*, 48 1-50.
- Saito, H. 2004. Phylogenetic significance of the radula in chitons, with special reference to the Cryptoplacoidea (Mollusca: Polyplacophora). *Bolletino Malacologico* 5: 83-104.
- Schwabe, E. 2005. A catalogue of recent and fossil chitons (Mollusca: Polyplacophora) Addenda. *Novapex*, 6: 89–105.
- Schwabe, E. 2010. Illustrated summary of chiton terminology (Mollusca: Polyplacophora). *Spixiana*, 33(2): 171-194.

- Sirenko, B. 1993. Revision of the system of the order Chitonida (Mollusca: Polyplacophora) on the basis of correlation between the type of gills arrangement and the shape of the chorion processes. *Ruthenica*, 3: 93–117.
- Sirenko, B. 1997. The importance of the development of articulamentum for taxonomy of chitons (Mollusca, Polyplacophora). *Ruthenica*, 7: 1–24.
- Sirenko, B. 2006. New Outlook on the system of chitons (Mollusca: Polyplacophora). *Venus*, 65(1-2): 27-49.
- Steel, M. y D. Penny. 2000. Parsimony, likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics *Molecular Biology and Evolution*, 17: 839-850.
- Thiele, J. 1909–1910. Revision des Systems der Chitonen. *Zoologica Stuttgart*. 22:1–70, pls 1–6 (1909); 71–132, pls 7–10 (1910).
- Trivedi, S., A. A. Aloufi, A. Abid, K. A. Sankar y S. K. Ghosh. 2016. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 161–171
- Van Belle, R. A. 1983. The systematic classification of the chitons (Mollusca: Polyplacophora). *Information from the Belgian Society of Malacology*, 13: 49–59.
- Vendrasco, M. J., D. J. Eernisse, C. L. Powell y C. Z. Fernandez. 2012. Polyplacophora (Mollusca) From the San Diego formation: a remarkable assemblage of fossil chitons from the Pliocene of Southern California. *Natural History Museum of Los Angeles County, Contributions in Science*, 520: 15–72.
- Wingstrand, K. G. 1985. On the anatomy and relationships of recent Monoplacophora. *Galathea*, 16: 7-94.
- Zhang, D. y G. M. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563–584.

Contenido de los capítulos

Este estudio considera dos puntos de vista de la taxonomía de la Clase Polyplacophora, el primero se enfoca en la taxonomía morfológica y el segundo en la diferenciación y relaciones de las especies con base en las secuencias del gen COI. En el capítulo 1 se realiza una descripción detallada de la morfología de las especies, apegada a los criterios de la taxonomía del grupo, presentando evidencia fotográfica bajo la técnica de la microscopía electrónica de barrido. Se enfatiza en las diferencias y similitudes de los caracteres morfológicos de las valvas, perinoto y dientes de la rádula, los cuales han sido utilizados consistentemente para reconocer a las especies de polioplacóforos. El capítulo 2 se refiere a la obtención, secuenciación y análisis del gen COI de las especies problema. Al final se presenta una discusión que conjunta la evidencia morfológica y genética de las especies, para establecer la identidad de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. de Guerrero, México.

Capítulo 1. Caracterización morfológica de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. de Guerrero

Resumen

Se caracterizó la morfología de las especies conocidas de los géneros *Callistochiton* y *Stenoplax* del Pacífico mexicano (*C. colimensis*, *C. elenensis*, *S. mariposa*, *S. limaciformis*) para determinar la identidad taxonómica de ejemplares definidos hasta el momento como *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. que se encontraron en el litoral rocoso del estado de Guerrero. Se realizó un análisis comparativo de las microestructuras de las valvas, perinoto y rádula, por medio de microscopía electrónica de barrido. Se obtuvieron imágenes del tegumento de las valvas, de la superficie de los derivados del perinoto y de los dientes central, menor lateral y mayor lateral de la rádula de cada especie.

Adicionalmente se examinó el material tipo de las especies con mayor similitud (i.e. *C. colimensis*, *C. elenensis*, *C. expressus*, *S. rugulata* y *S. mariposa*). Los resultados sugieren que *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. presentan características morfológicas diferentes a las especies conocidas hasta ahora para la región y pueden ser consideradas como nuevas especies. *Callistochiton* sp. nov. se caracteriza por presentar escultura del tegumento granular, con costillas en las áreas centrales en un patrón sub-reticulado, áreas yugales con una quilla central y escamas con una superficie bimórfica de costillas basales y esferas ligeramente elevadas. *Stenoplax* sp. nov. se diferencia por presentar una talla máxima de 12.3 mm, con una sub-escultura rugosa presente únicamente en la periferia de las valvas.

Introducción

Los quitones son moluscos comunes del litoral rocoso del Pacífico Oriental, en México se conocen 102 especies vivientes; sin embargo, pocos son los estudios que se han referido a su taxonomía y distribución, sobre todo en la región del Pacífico Tropical Mexicano (Reyes-Gómez, 2004, 2016). En 2011, se caracterizó la composición y distribución de la fauna Polyplacophora del litoral rocoso del Estado de Guerrero a partir de muestreos en 24 localidades de la Costa Chica (Sur), Acapulco (Centro) y Costa Grande (Norte) (Flores-Garza *et al.*, 2012; Galeana-Rebolledo *et al.*, 2014). Estos estudios identificaron 19 especies para la región e incluyeron ampliaciones de distribución de especies comunes en otras regiones biogeográficas. En particular para *Lepidozona serrata*, considerada como especie típica del Pacífico Norte, en EUA, en La Paz, BCS y en el golfo de California (Ferreira, 1979; Kaas y Van Belle, 1987; Reyes-Gómez, 2016); *Stenoplax mariposa* del golfo de California; y *Stenoplax rugulata* (Sowerby, 1832), registrada en Nicaragua, Perú, Ecuador y las Islas Galápagos (Kaas y Van Belle, 1990).

Recientemente Reyes-Gómez (2016) revisó a detalle la escultura del tegumento de las valvas, revelando que las especies identificadas por Flores-Garza *et al.* (2012) y Galeana-Rebolledo *et al.* (2014) como *Lepidozona serrata*, *Stenoplax mariposa* y *Stenoplax rugulata*, presentaban particularidades en el tipo de tegumento, que no es concordante con dichas especies. Estas diferencias fueron interpretadas como una posible variabilidad geográfica, ya que se ha observado éste patrón en otras especies a lo largo de su distribución geográfica. Por ejemplo, *Stenoplax limaciformis* se distribuye a lo largo de la Provincia Panámica, y en las poblaciones de Centroamérica y Panamá se han observado diferencias en el número de costillas (Bullock, 1985). Recientemente en México, se examinaron individuos de *S. limaciformis* de La Paz, B.C.S., que presentaron tallas mayores (37.2 mm), y las costillas son ligeramente entrecortadas en comparación con los especímenes de Guerrero y Oaxaca (29 mm), desarrollan nódulos en las costillas periféricas de las valvas, producto del excesivo entrecortamiento de las costillas. Además, en

Chaetopleura lurida Sowerby, 1832, que se distribuye desde el Golfo de California hasta Colombia, se han registrado individuos de La Paz, B.C.S con mayor número de costillas (5-7) simétricamente alineadas; mientras que los especímenes de Guerrero y Oaxaca presentan menor número de líneas de pústulas (4-5), que además se organizan irregularmente (Reyes-Gómez, 2016).

Con base en los atributos morfológicos de los individuos analizados, se reconocieron dos entidades; *Stenoplax* sp. (determinadas previamente como *S. mariposa* y *S. rugulata*) y *Callistochiton* sp. (antes *L. serrata*). Ambas especies, al ser comparadas con las especies conocidas del Pacífico Mexicano y la Provincia Panámica, no presentaron elementos del tegumento afines con las especies de Guerrero. Sin embargo, aunque el tegumento representa un carácter taxonómico que puede definir a las especies de ambos géneros, otros elementos se toman en cuenta para su identificación (articulamento, los dientes de la rádula y las escamas del perinoto), los cuales quedaron pendientes en el análisis morfológico inicial. De acuerdo a estas observaciones, ambas especies se encuentran en estatus de especies provisionales. Tanto *Stenoplax* sp. como *Callistochiton* sp. requieren de un estudio integral que incluya no solo características morfológicas detalladas mediante microscopía electrónica y multifocal para reconocer caracteres específicos sino también las características genéticas que corroboren y permitan definir con certeza su identidad taxonómica.

Justificación

La taxonomía basada en la descripción de rasgos morfológicos, en especial de un grupo poco conocido como los quitones, puede representar retos de interpretación. Para evitar ambigüedades, mejorar la identificación y contar con inventarios fidedignos de especies, se requiere integrar un acervo de imágenes de microscopía electrónica de barrido y de microscopía multifocal que muestren explícitamente los caracteres y enriquezcan las descripciones.

Objetivo

Describir los atributos morfológicos de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp., y compararlos con los de las especies conocidas (*C. colimensis*, *C. elenensis*, *C. expressus*, *S. mariposa* y *S. limaciformis*) que comparten su ámbito de distribución en el Pacífico Oriental Tropical.

Materiales y Métodos

Además de las especies provisionales, *Stenoplax* sp. (como *S. mariposa* y *S. rugulata* en Flores-Garza *et al.*, 2012 y Galeana-Rebolledo *et al.*, 2014) y *Callistochiton* sp. (como *L. serrata* en Flores-Garza *et al.*, 2012 y Galeana-Rebolledo *et al.*, 2014), se incluyeron especies del mismo género con similitud morfológica y con distribución en el Pacífico Mexicano. De esta manera el análisis comparativo comprendió a *Callistochiton elenensis* (Sowerby *in* Broderip & Sowerby, 1832), *Callistochiton colimensis* (A.G. Smith, 1961) (espécimen tipo, localidad tipo Colima, México) y *Callistochiton expressus* (Carpenter, 1865) (espécimen tipo, localidad tipo en Panamá). Del género *Stenoplax*, se incluyó a *Stenoplax mariposa* (Dall, 1919), *Stenoplax limaciformis* (Sowerby, 1832) y el material tipo de *S. rugulata* (espécimen tipo, localidad tipo Isla Lobos, Perú).

En adición se incluye la observación de material depositado en colecciones científicas; en cada caso se indica la procedencia con el acrónimo de la colección malacológica: Colección Nacional de Moluscos (CNMO); Colección Malacológica de la Estación de Mazatlán, UNAM (EMU); así como el número de individuos examinados. El material en el que no se indica número de catálogo, representa a individuos integrados al material examinado.

Desarticulación de los individuos

Seis individuos adultos de cada especie fueron totalmente desarticulados para las observaciones de las valvas, la rádula y el cinturón. Para obtener las estructuras completas

sin dañar la placa de inserción y eliminar los epibiontes, se expusieron a una solución degradadora de tejido. Los quitones se sumergieron en una solución de KOH (sosa) y agua destilada fría al 80% por seis horas para eliminar el tejido orgánico. Una vez que las estructuras estuvieron limpias se enjuagaron con agua destilada y se almacenaron en etanol al 95%. Para eliminar los sedimentos, se aplicaron cuatro sesiones (30 segundos cada una), en un sonicador a las revoluciones estándar, y se almacenaron en etanol absoluto.

Se seleccionaron las valvas I–VIII, rádula y cinturón de dos individuos de cada especie para su preparación para la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB); dos individuos para la toma de imágenes multifocal, y dos para examinarlos en el microscopio de luz.

Microscopía Electrónica de Barrido

El microscopio electrónico de barrido (MEB) utiliza lentes electromagnéticas, sistema de vacío, aperturas y un cañón de electrones. El MEB, acelera los electrones para formar un haz muy fino que incide sobre la superficie de la muestra, y debido al tamaño pequeño de las aperturas y la longitud de onda de los electrones tan corta, se puede conseguir una gran profundidad de campo (y por lo tanto información mucho más detallada de la muestra) comparada con la imagen que se obtendría con un microscopio óptico si se usa el mismo aumento (Robertson, 1971).

Para iluminar la muestra, el haz de electrones es producido al calentarse un filamento metálico dispuesto en el cañón, en la parte superior del microscopio. Cuando los electrones son liberados del átomo, se comportan de forma análoga a la luz. Este comportamiento es el que se aprovecha en la microscopía. Este haz, sigue una trayectoria vertical a través de la columna del microscopio y se dirige y enfoca sobre la superficie de la muestra mediante un arreglo de lentes electromagnéticas. Las lentes funcionan creando un campo electromagnético perpendicular a la dirección de la ruta del electrón haciendo que los rayos que tienden a dispersarse, se junten y se proyecten sobre un punto focal. Una vez que el haz de electrones (primarios) incide sobre la superficie de la muestra, provoca que otros

electrones (retro-dispersados y secundarios) sean proyectados de la misma. Los detectores recolectan electrones secundarios o retro-dispersados y los convierten en una señal que es enviada al monitor, en forma de imagen. Los electrones por su baja energía, son utilizados para generar imágenes tridimensionales al ser recolectados mediante un detector para electrones secundarios (Muller y Grazul, 2001).

La muestra, se fija a una base metálica de aluminio y es aterrizado para evitar la estática por las cargas de alto voltaje cuando los electrones golpean la muestra. Es necesario orientar la muestra de manera precisa respecto a haz de electrones que inciden y el detector. Para ello se utilizan las funciones de movimiento en x, y, z, así como la inclinación del microscopio. Mientras el MEB funciona, la columna y la muestra deben estar al vacío, la ausencia de moléculas en la ruta del haz, permite que éste viaje libremente y logre incidir sobre la muestra y protege al filamento de que se funda. Finalmente, la profundidad de campo controla el tamaño de la mancha y número de electrones que inciden sobre la muestra, las aperturas son empleadas para controlar la profundidad de campo en la muestra y lograr el aumento deseado (Bozzola *et al.*, 1991).

Preparación de muestras para el microscopio de barrido

Las muestras destinadas para la observación, con la técnica de MEB, han de cumplir la condición de deshidratación total y de tener capacidades conductoras. El proceso de secado se llevó a cabo por deshidratación química con etanol absoluto. Posteriormente, se le recubrió (“sputtering”) de carbón y oro, que le confieren la propiedad de conductividad, y que se realiza en alto vacío.

Esta técnica utiliza electrodos de carbono para evaporar el metal (oro) y obtener “films” o capas de grano más fino para obtener las mejores condiciones de imagen. Se usó un microscopio electrónico Hitachi SU1510.10.0kV, en el Laboratorio de la Biodiversidad I, del Instituto de Biología, UNAM en la Ciudad de México.

Microscopía multifocal

Se fotografiaron individuos adultos, en vista dorsal y lateral, por medio de la microscopía multifocal. Se usó un equipo Leica Z16 APOA Multifocus (Multi-enfoque) y el programa Application Suite Core, en el Laboratorio de la Biodiversidad II, del Instituto de Biología, UNAM. La combinación de ambos, permite obtener una única imagen nítida, que incluye relieves bajos y altos, por medio de la ampliación de la profundidad de enfoque.

El módulo multi-enfoque LAS se integra a la cámara digital para capturar automáticamente una pila de imágenes, que pueden ir de 3 a 40 (imagen de pila), con diferentes posiciones de enfoque. Una vez capturadas las imágenes se combinan formando una sola imagen de enfoque extendido que muestra todas las partes enfocadas de la pila. El resultado es una imagen de Alta Definición, que expone una imagen altamente informativa de las estructuras en bajo y alto relieve.

Resultados

En esta sección se presentan las descripciones morfológicas de las especies provisionales y de las especies seleccionadas de los mismos géneros. Se incluyen comentarios taxonómicos de cada una. Adicionalmente, se compilaron cuadros sinópticos comparativos con los principales caracteres distintivos de las especies de los géneros *Callistochiton* y *Stenoplax* (Anexo A, Cuadros 1-6).

Los criterios taxonómicos se presentan de acuerdo con Schwabe (2010) y la clasificación taxonómica de acuerdo con Sirenko (2006).

Clase POLYPLACOPHORA Gray, 1821

Orden CHITONIDA Thiele, 1910

Suborden CHITONINA Thiele, 1910

Familia ISCHNOCHITONIDAE Dall, 1899

Género *Callistochiton* Carpenter MS, Dall, 1879

Callistochiton sp.

Figuras 6A–H, 7A–F, 8A–F, 9A–F

Material examinado. Talla máxima 12.1 x 5.93 mm de longitud. 1 individuo, Playa Tlacopanocha , Acapulco (16°50'41.5"N, 99°54'25.02"O), CNMO5190; 1 individuo, Parque de la Reina, Acapulco (16°50'58.2"N, 99°54'01.85"O), CNMO5191; 1 individuo, Playa Manzanillo, Acapulco (16°50'27.9"N, 99°54'38.1"O), CNMO5198; 1 individuo, Ojo de Agua, Tecpan de Galeana (17°18'01.8"N, 101°03'05.8"O), CNMO5815; 1 individuo, Playa Troncones, La Unión (17°47'35"N, 101°44'46.6"O), CNMO5829; 1 individuo, Playa Troncones, La Unión (17°47'35"N, 101°44'46.6"O), CNMO5829; 1 individuo, Playa Manzanillo, Acapulco (16°50'27.9"N, 99°54'38.1"O), CNMO5831; 10 individuos, Playa Manzanillo, Acapulco (16°50'27.9"N, 99°54'38.1"O), CNMO6067.

Descripción. Quitones pequeños, forma del cuerpo ovalado, ligeramente elevado. Color del tegumento en individuos vivos es variable, en general café, crema claro (marfil), verde olivo y ocasionalmente rojizo y café oscuro, con pequeños puntos y manchas verde oscuras en todas las valvas sin un orden aparente (Figuras 6A–H, 7A, C, E). Cinturón color marfil, con manchones, longitudinales, irregulares de verde oscuro o café oscuro

(Figura 6C, F). Valva cefálica (Figura 8A), semi-circular, con 11–13 costillas, que en individuos adultos se pueden bifurcar hacia la periferia de la valva; costillas constituidas de 13-16 pequeñas pústulas, que suelen estar erosionadas, observándose como ondulaciones ligeramente elevadas; margen posterior con 9-10 dientes; muesca amplia y onda. Valvas intermedias (Figura 8C), de forma sub-rectangular, no elevadas, casi planas; margen anterior convexo, margen posterior recto; áreas laterales (Figura 8D), visibles por dos costillas de pequeñas pústulas, que se separan hacia el margen lateral y separadas entre sí por un surco intermedio ancho moderadamente profundo; la costilla contigua al área central, presenta de 11–13 pequeñas pústulas, apenas perceptibles; margen posterior (Figura 8E), con 10–12 dientes, que se acentúan en tamaño y grosor hacia el margen lateral. Áreas centrales con escultura sub-granular (Figura 8E), con costillas elevadas, longitudinales de 10–12 en cada área pleural, con un patrón de sub-reticulado; área yugal reducida y elevada, a la altura de las costillas longitudinales; en la parte posterior del área yugal el tegumento forma un patrón reticular; sin ápice. Valva anal (Figura 9B) más ancha que larga, ligeramente más pequeña que la valva cefálica; margen anterior ligeramente convexo; área anteromucronal en forma sub-triangular, escultura del tegumento como en las áreas centrales con 7–9 costillas longitudinales; el área yugal presenta una costilla central elevada al mismo nivel que las costillas en las áreas pleurales; área postmucronal deprimida, reducida con 9–11 costillas, las costillas contiguas a la línea diagonal con 6–8 pústulas, más grandes que en la valva cefálica y las áreas laterales, las costillas subsecuentes se acortan cerca del mucro, con 4–6 pústulas. Articulamento, blanco, delgado, corto; hendiduras de inserción angostas y hondas; apófisis (Figura 9A), sub-rectangulares, conectadas por la placa yugal que es continua de apófisis a apófisis (Figura 8F); fórmula de las hendiduras 9–11/1/9. Cinturón cubierto por pequeñas escamas (Figura 9C), sub-rectangulares, más anchas (2 veces) que alargadas, de bordes redondeados, con superficie de finas costillas cortas, longitudinales, localizadas de la base de la escama hacia la parte media, que se continúan de esferas alargadas, hasta el borde apical, las esferas organizadas en un denso patrón de quince (Figura 9D). Rádula (Figura 9E), con diente central alargado, angosto, el margen apical se dobla hacia afuera, formando una estructura lobular constreñida

ligeramente en el centro; diente menor lateral pequeño, apicalmente presenta una forma de gancho, ancho dirigido hacia adentro, con una pequeña prolongación o placa posterior, con forma irregular; diente mayor lateral uni-cúspide, en forma de gancho, alargado (Figura 9F).

Comentarios taxonómicos

Callistochiton sp. fue inicialmente registrada como *Lepidozona serrata* para las áreas coralinas de Oaxaca central (Reyes-Gómez *et al.*, 2010), y subsecuentemente listada para las costas rocosas de Guerrero. De acuerdo con estos autores, los dientes del margen posterior de las valvas (I–VII), correspondían con las de *L. serrata*, que le confieren su nombre y que se distribuye comúnmente en Baja California. La examinación de *L. serrata* de playa La Balandra, La Paz B.C.S. (Figuras 17A–D), presentó escultura del tegumento diferente en las áreas centrales al de la especie de Guerrero, así como inconsistencias en el número de las costillas (Figuras 17C, D), la morfología de los dientes central y menor lateral de la rádula, y en la ornamentación de las escamas. La examinación de *Callistochiton* sp., mostró la mitad del número de costillas en la valva cefálica y en las áreas laterales; además las áreas centrales revelaron un patrón de sub-red, y la presencia de esferas apicales en las escamas. La presencia de elevadas costillas pustulosas, amplios surcos y áreas laterales bicostadas (con 2 costillas) sugieren que esta especie corresponde al género *Callistochiton*.

El tegumento de *Callistochiton* sp. presentó costillas longitudinales, regulares en forma, altura y grosor, y dentro de las columnas que forman las costillas, se observan corpúsculos lobulares, redondeados, irregulares en tamaño, dando una apariencia granular. El tipo de escultura del tegumento de las áreas centrales de las valvas, también se observó en *Callistochiton expressus* (Carpenter, 1865), que se distribuye continuamente desde Mazatlán a Perú (Kaas y Van Belle, 1994; Reyes-Gómez, 2016). La examinación del lectotipo PRM395 (Figura 16), localidad tipo Panamá, presentó menor número de costillas en la valva cefálica (10 costillas), y las pústulas de la valva cefálica y las áreas laterales

fueron casi imperceptibles. La examinación de *C. expressus* de 9.8 mm de longitud, colectada en La Unión Maculis, El Salvador CBUPRH2083 (Figura 15D), presentó las mismas características del tegumento y número de costillas de las valvas que el material de Panamá. La placa de inserción de *Callistochiton* sp. y la del holotipo son muy similares, aunque se observó menor número de costillas en la valva cefálica, que puede ser debido al estado de madurez del individuo, como lo mencionan Kaas y Van Belle (1994). Sin embargo, la descripción de los mismos autores incluye también observaciones de individuos adultos, donde la escultura de tegumento, número de costillas, diente central y menor lateral, corresponden con *Callistochiton* sp. La ornamentación de las escamas del cinturón es el elemento más distinto a *C. expressus*, el cual muestra 24 costillas con apariencia de reticulada. Este carácter morfológico, distintivo de *Callistochiton* sp., sugiere que la especie de Guerrero representa a una nueva especie, estrechamente emparentado con *C. expressus*.

***Callistochiton elenensis* (Sowerby, 1832)**

Figuras 10A–F, 11A–E, 12A–F

Material examinado. Talla máxima 14.80 x 11.68 mm de longitud. 2 individuos, Parque de la Reina, Acapulco (16°50'58.3"N, 99°54'01.8"O), CNMO5199; 1 individuo, Playa Las Gatas, Zihuatanejo de Azueta (17°37'17.5"N, 101°33'14.2"O), CNMO5261; 2 individuos, Playa Manzanillo, Acapulco (16°50'27.9"N, 99°54'38.1"O), CNMO5304; 1 individuo, Playa Tlacopanocha, Acapulco (16°50'41.5"N, 99°54'25.02"O), CNMO5311; Playa Troncones, La Unión (17°47'35"N, 101°44'46.6"O), CNMO5325; 2 individuos, Parque de la Reina, Acapulco (16°50'58.3"N, 99°54'01.8"O), CNMO5820; 1 individuo, Playa La Barrita, Petatlán (17°24'32.7"N, 101°10'51.3"O), CNMO5821; 7 individuos, Playa La Barrita, Petatlán (17°24'32.7"N, 101°10'51.3"O), CNMO5823.

Descripción. Quitones pequeños, ovalados-alongados (Figuras 10A–F), color del tegumento en individuos vivos es crema, café claro, con pequeñas manchas café oscuro, presente en todas las valvas sin ningún arreglo particular. Valva cefálica (Figuras 11C, 12A), semicircular, con borde anterior ondulado, el borde posterior es amplio en forma de V, con 8–9 dentículos a cada lado; escultura del tegumento con 8-9 costillas radiales; cada costilla presenta de 12–15 pústulas anastomosadas. Valvas intermedias (Figuras 11E, 12B),

sub-rectangulares, bordes laterales ondulados; borde posterior convexo; margen posterior con 12–13 dentículos; sin ápice. Áreas laterales con 2 costillas, con 12–14 pústulas; áreas centrales desarrollan un patrón reticulado, regulares longitudinales, con 12–15 en cada área pleural, la escultura tiene una apariencia de red; área yugal con escultura, aunque suele estar erosionada. Valva anal (Figuras 11D, 12D), semicircular, más ancha que larga; borde anterior, ondulado; área anteromucronal con escultura igual a la de las áreas laterales, con 10–11 costillas (a cada lado) longitudinales; mucro no elevado, en posición ante-medio. Área postmucronal reducida, con 7–9 costillas radiales, constituidas por 12–14 pústulas. Articulamento grueso, blanco y reducido, dirigido hacia adentro; apófisis anchas y cortas, dientes de inserción, cortos, anchos y lisos; el borde del tegumento ligeramente esponjoso; fórmula de las hendiduras de 8-9/1/7–9. Cinturón cubierto por pequeñas escamas (Figura 12E), con superficie de 9–13 costillas. Rádula (Figura 12F), con diente central sub-rectangular, con su borde anterior doblado hacia afuera, diente mayor lateral tricúspide, las cúspides laterales son más pequeñas que la cúspide central.

Comentarios taxonómicos

Esta especie se caracteriza por presentar costillas con una apariencia ondulada y por lo evidente de las pústulas; así como las áreas centrales que mostraron un patrón sub-reticulado.

La comparación con *Callistochiton* sp., mostró varios elementos morfológicos distintivos; primero las pústulas de las costillas de *C. elenensis* están elevadas y desarrolladas en todas las valvas, sin romperse o erosionarse (Figuras 12A, B, D). De igual forma, la organización reticular en las áreas centrales y el área anteromucronal de la valva anal, mostró un patrón geométrico de red. Mientras que en *Callistochiton* sp. las pústulas se elevan ligeramente en la valva cefálica y se pronuncian en las áreas laterales y en la región postmucronal de la valva anal (Figuras 8B, D). Las áreas centrales de *Callistochiton* sp., presentan tegumento sub-reticulado (Figura 8E), es decir, las costillas longitudinales están presentes, pero las líneas verticales están sub-desarrolladas sin fusionarse completamente. Además, el mucro

de *C. elenensis* presenta una posición ante-media, no elevado, desarrollándose como una pequeña protuberancia (Figuras 11D, 12D); y las escamas del cinturón presentan una superficie de 12–15 costillas o listones aplanados. *Callistochiton* sp. presenta el mucro en posición post-media, medianamente elevado (Figura 9B), y las escamas del cinturón presentan dos elementos, uno de costillas en la base de la escama hacia su parte media, que continua con esferas medianas de la parte media hacia la parte apical (Figura 9D). Los dientes de la rádula distan considerablemente, mientras que en *C. elenensis* el diente mayor lateral es tricúspide, y el diente central es una placa ancha sub-rectangular (Figura 12F); *Callistochiton* sp. reveló un gancho con una sola cúspide, y el diente central es una placa angosta, lobulada anteriormente (Figura 9F),

Las observaciones sugieren, que ambas especies presentan elementos diagnósticos del género *Callistochiton*. Sin embargo, *C. elenensis* no refleja los atributos específicos de *Callistochiton* sp. Por lo tanto, ambas especies son entidades diferentes, que se distribuyen simpátricamente en las costas de Guerrero.

***Callistochiton colimensis* (A.G. Smith, 1961)**

Figuras 14A–C, 15A–F

Material examinando. Talla máxima 12.74 x 6.15 mm de longitud. 5 individuos, Punta Chile, Mazatlán, Sinaloa (23.1°17.4'09"N, 107°32'62"O), EMU1639; 1 individuo, Punta Mita, Nayarit (20.78°41.4'24"N, 105.52°19'31"O), EMU1641; 1 individuo, Isla de la Piedra, Mazatlán (23.1°12.3'09"N, 106°27'60"O).

Descripción. Quitones pequeños, forma del cuerpo oval, moderadamente elevado, color en individuos vivos es café claro y oscuro, crema (marfil), con manchas oscuras en algunas partes de las valvas en individuos vivos (Figura 14C). Tegumento micro granuloso, de costillas bi-costadas o costillas bifurcadas, que se fusionan, dándole una apariencia pustulosa (Figuras 14A–C). Valva cefálica (Figura 14A) semicircular, borde posterior en forma de V muy abierta, semi lobulado o dentado con gruesas ondulaciones; muesca presente, indicada por una pequeña depresión con 11–13 costillas radiales, que se bifurcan hacia su periferia. Valvas intermedias (Figura 14B) sub-rectangulares, margen posterior

recto, ápice casi inexistente; el área alrededor del ápice erosionada: áreas laterales elevadas con 2 costillas, bicostadas o surcadas (2 costillas muy juntas, casi fusionadas), áreas centrales con 13–15 costillas, que forman un patrón reticulado, presentes en el área yugal y que se separan entre ellas dirigiéndose hacia los lados del área yugal. Valva anal (Figura 14C), semicircular, ligeramente más alargada que ancha, mucro indicado por una pequeña protuberancia, no elevado, ante-medio, área anteromucronal reticulada igual que las áreas centrales; área postmucronal con 10–11 costillas radiales, bifurcadas. Articulamento de color blanco, apófisis semi-ovales; fórmula de las hendiduras de inserción 9–10/1/9–10, hendiduras cortas, dientes de inserción ligeramente estriada en su superficie, borde sólido. Cinturón cubierto de escamas ovales (Figura 14E), de superficie finamente esculpida con 10–16 estrías longitudinales. Rádula (Figura 14F) con un diente central angosto en su base, distalmente ensanchada, diente menor lateral, corto, pequeño con un apéndice lateral, diente mayor lateral tricúspide, con la cúspide media más larga y ancha que las laterales.

Comentarios taxonómicos

Esta especie fue revisada por Ferreira (1979), quién incluyó imágenes de microscopía electrónica de un espécimen completo de 17 mm de longitud de Bahía Cuastecomates, Jalisco, en el cual se muestra claramente un tipo de costillas con formación peculiar denominada “surcadas”. Estas consisten de un par de costillas medianamente ensanchadas, muy cercanas entre sí, sin fusionarse y que forman un surco (denominado surcado), que más que separarlas las une, porque ambas costillas se consideran como una sola debido a su acomodo en pares, y en algunos individuos están fusionadas. Ferreira también incluyó una imagen de microscopía electrónica de la superficie de las escamas que presentan costillas longitudinales, apenas presentes. Kaas y Van Belle (1994) describe las mismas características de las costillas y coincide con Ferreira, en la escultura del área yugal con reticulado fino, de la misma consistencia y grosor de los presentes en las áreas pleurales. La examinación del holotipo (ANS 152139) de Manzanillo, Colima (Figura 16), presentó las mismas características en el tipo de escultura de las costillas y en el patrón de reticulado,

que a simple vista parece presentar mayor número de costillas, por la condición de las costillas sulcadas, que en realidad van en pares.

La comparación de *C. colimensis* y *Callistochiton* sp., sugiere que ambas especies son entidades diferentes. El primer atributo distintivo que presenta *Callistochiton* sp. es la ausencia de costillas surcadas, pero desarrollando costillas onduladas de pequeñas pústulas, que son más evidentes en las áreas laterales y en el área postmucronal de la valva anal (Figuras 8D, 9B). El mucro aparece como un punto ligeramente elevado y en posición antemedial en *C. colimensis*, mientras que en *Callistochiton* sp. es ligeramente deprimido y post-medio. La examinación de la microestructura de los dientes de la rádula de *Callistochiton* sp. mostró una placa alargada, que mantiene su grosor desde su base hasta el área apical que se ensancha doblándose hacia afuera, y el diente mayor lateral es unicúspide en forma de gancho. Kaas y Van Belle (1994), describen el diente central de *C. colimensis* con una base angosta, alargada hasta su parte media ensanchándose hasta formar una estructura ovalada en su parte apical; además el diente mayor lateral es tricúspide con la cúspide media más grande que las laterales. La examinación de *C. colimensis* de Mazatlán, mostró que las costillas surcadas pueden fusionarse, perdiendo el surco entre los pares de costillas, desarrollando costillas más gruesas, poco elevadas que se bifurcan hacia la periferia de la valva, sobre todo en la valva cefálica. El área postmucronal, a diferencia de las descripciones, se observó con costillas más cortas y delgadas, que son menos conspicuas que las de la valva cefálica y las áreas laterales.

Uno de los caracteres que inicialmente se tomó en cuenta para considerar a *Callistochiton* sp. como una nueva entidad, fue la superficie bimórfica de las escamas del cinturón; con costillas cortas basales y en su parte media hasta la región apical, que se encuentra cubierta de esferas ligeramente elevadas (Figuras 9C, D), que es consistente al comparar con la descripción del holotipo de *C. colimensis* y con los individuos de Jalisco en la revisión de Ferreira. La distribución de ambas especies, de acuerdo con los registros de dichos autores, indica que son simpátricas en el Pacífico Tropical Mexicano.

***Callistochiton expressus* (Carpenter, 1865)**

Figuras 14D, 17A–F

Material examinando. Talla máxima de 9.8 mm de longitud, 1 individuo, La Unión Maculis, El Salvador (13°20'13"N, 87°50'38"O), CBUPRH2083.

Descripción. Quitón pequeño, forma del cuerpo oval, elevado, color en fresco es crema y café-rojizo oscuro, las tonalidades claras se localizan en la parte central de las valvas, y las áreas o manchones oscuros se concentran en la periferia de las valvas en un patrón irregular; cinturón con bandas claras y oscuras intercaladas (Figura 14D). Tegumento de costillas poco elevadas, y pústulas apenas perceptibles, y sub-reticulado en las áreas intermedias. Valva cefálica (Figura 17A) semicircular, con 12 costillas poco elevadas que se ensanchan o engrosan hacia la periferia. Valvas intermedias (Figura 17B) áreas centrales con 12 costillas longitudinales en cada área pleural; áreas laterales con dos costillas radiales, con pústulas ligeramente más elevadas que en la valva cefálica. Valva anal (Figura 17C), dos veces más ancha que larga; el tegumento del área yugal se extiende anteriormente hasta la región de la placa yugal; la parte media del área anteromucronal incluyendo la región yugal de elevada es elevada; área postmucronal con tenues costillas radiales, las pústulas periféricas son más evidentes que las que se encuentran cerca del mucro; mucro poco elevado localizado en posición post-media. Articulamento poco extendido; apófisis sub-rectangulares, más angostas en las valvas intermedias; fórmula de las hendiduras de inserción 9–10/1/8–9. Cinturón (Figura 17D) cubierto de escamas sub-rectangulares, dos veces más anchas que largas, con superficie finamente esculpida con 24–30 costillas longitudinales basales que se entrecortan en pequeños corpúsculos redondeados hacia la región media de la escama y hasta la región apical. Rádula (Figura 17E) con diente central ensanchado apicalmente, diente menor lateral más pequeño que el central con una placa más ancha y lobular en la región apical y el diente mayor lateral unicúspide en forma de gancho (Figura 17F).

Comentarios taxonómicos

Ferreira (1979) y Kaas y Van Belle (1994) establecieron a *C. expressus* como una especie con amplio rango de distribución desde Playa Cerritos, Sinaloa a Santa Elena, Ecuador; además estudiaron su morfología de en detalle, especialmente de especímenes de la localidad tipo en Mentabe, Panamá (Figura 18). Sin embargo, aunque se ha señalado la presencia de esta especie en México, los estudios faunísticos de la región (Holguín-Quñones y González-Pedraza, 1994; Hendrickx *et al.*, 2005, 2007) no hacen referencia a esta especie. Recientemente, García-Ríos *et al.* (2003) registró *C. expressus* para el intermareal rocoso de El Salvador, pero los atributos morfológicos de los individuos no fueron mencionados en este estudio.

La examinación de un individuo (9.8 mm de longitud) colectado en La Unión Maculis, El Salvador, reveló concordancia en los caracteres de las valvas y la rádula de la descripción original de la especie. Sin embargo, la ornamentación de las escamas del cinturón del espécimen de El Salvador, mostró diferencias con respecto a la descripción de Kaas y Van Belle (1994) de aproximadamente 24 costillas aplanadas longitudinales; mientras que el individuo examinado, reveló costillas basales longitudinales (24–30) que se entrecortan en la parte media de la escama formando corpúsculos esféricos. La comparación de *C. expressus* y *Callistochiton* sp. muestra un grado importante de similitud morfológica; aunque se observan detalles en la escultura de las valvas y de las escamas que permiten su diferenciación. *Callistochiton* sp. presenta costillas que se pueden bifurcar hacia la periferia de la valva cefálica, además de la presencia de una quilla (costilla central, elevada en el área yugal) en las valvas intermedias, y las escamas del cinturón presentan una curvatura apical. Mientras que *C. expressus* presenta costillas ligeramente aplanadas que se ensanchan hacia la periferia de la valva, sin registros de bifurcación, y las valvas intermedias presentan escultura de costillas similares a la de las áreas pleurales o sin quilla, las escamas del cinturón son sub-rectangulares sin aparente curvatura apical, más bien aplanadas. *Callistochiton expressus*, requiere de un estudio más profundo y de mayor número de individuos de diferentes localidades en Centroamérica y la localidad tipo, para

establecer sus atributos morfológicos, especialmente de las escamas del cinturón. De la misma forma se requiere un estudio más detallado a la comparación morfológica y conocer la relación que presenta con *Callistochiton* sp. de Guerrero.

Stenoplax (Carpenter MS) Dall, 1879

***Stenoplax* sp.**

Figuras 20A–G, 21A–F, 22A–F, 23A–F, 24A–E

Stenoplax (Stenoplax) mariposa en Reyes-Gómez *et al.*, 2010: fig. 2M.

Material examinado. Talla máxima de 12.3 x 4.90 mm de longitud. 1 individuo, Barra de Potosí, Petatlán (17°31'43.5"N, 101°27'08.2"O), CNMO5314; 1 individuo, Punta Maldonado, Cuajinicuilapa (16°19'35.5"N, 98°34'12.65"O), CNMO5728; 1 individuo, Playa Troncones, La Unión (17°47'35"N, 101°44'46.6"O), CNMO5730; 1 individuo, Playa Punta Maldonado, Cuajinicuilapa (16°19'35.5"N, 98°34'12.65"O), CNMO5732; 1 individuo, Playa La Barrita, Petatlán (17°24'32.7"N, 101°10'51.3"O), CNMO5736; 1 individuo, Playa Punta Maldonado, Cuajinicuilapa (16°19'35.5"N, 98°34'12.65"O), CNMO5734; 1 individuo, Playa La Barrita, Petatlán (17°24'32.7"N, 101°10'51.3"O), CNMO5738; 1 individuo, Playa Tlacopanocha, Acapulco (16°50'41.5"N, 99°54'25.02"O), CNMO5750; 1 individuo, Playa Troncones, La Unión (17°47'35"N, 101°44'46.6"O), CNMO5768; 1 individuo, Playa Majahua, Acapulco (16°50'58.2"N, 99° 54'01.8"O), CNMO6062; 1 individuo, Playa Manzanillo, Acapulco (16°50'27.9"N, 99°54'38.1"O), CNMO6068; 8 individuos, Playa La Barrita, Petatlán (17°24'32.7"N, 101°10'51.3"O), CNMO6071; 5 individuos, Playa La Barrita, Petatlán (17°24'32.7"N, 101°10'51.3"O), CNMO6072.

Descripción. Quitones pequeños, forma del cuerpo alongada oval; tegumento variable con manchones de diversos colores, verde olivo, café claro y oscuro, crema o marfil, gris, anaranjado, rosa, morado, amarillo (Figuras 20A–G); con finas líneas negras, longitudinales, curvadas, presentes en las áreas laterales que se pueden extender hacia las áreas pleurales en el borde posterior de la valva cefálica (Figuras 20E–G, 21A–E); usualmente con pequeñas manchas redondeadas color azul turquesa, presentes en las valvas sin un patrón aparente y generalmente ausentes en el ápice o área yugal de las valvas, que pueden fusionarse en las áreas pleurales, extendiéndose a las áreas laterales (Figuras 20A–E); el área yugal de las valvas usualmente presenta manchones más claros, crema, beige, blanco; el área yugal de la valva II puede presentar un color morado, rojo, rosa. Cinturón con tonalidades café claro, verde olivo, con bandas irregulares, longitudinales, en ocasiones manchones en tonalidades oscuras (Figuras 20D, G, 21F). Escultura del tegumento subdesarrollada, con rugosidades en las áreas laterales que pueden formar costillas

longitudinales, entre-cortadas principalmente en las áreas pleurales; estas rugosidades están presentes en la periferia de las valvas y hacia la parte media de las áreas pleurales y ausentes en el área yugal (Figuras 20A–F, 21E). Estetos grandes (magaestetos) son más evidentes en todo el tegumento (Figura 21F). Valva cefálica ligeramente más ancha que la anal, semicircular, con el margen posterior lobulado; muesca presente, ligeramente indicada; tegumento irregular, fuertemente rugoso en la periferia, que se desvanece hasta desaparecer en la parte media del tegumento; líneas de crecimiento presentes como líneas angostas, sólidas, concéntricas al ápice (Figuras 22A, B). Valvas intermedias subrectangulares; margen anterior ligeramente convexo en valvas II-III (Figuras 22C, D); cóncavo en la parte media de las valvas IV–VII (Figuras 22E, F); márgenes laterales redondeados; áreas laterales apenas presentes, visible en la línea diagonal, que se eleva ligeramente y se acentúa con un cambio o interrupción en la escultura; escultura rugosa, que forma en la periferia de las áreas laterales, costillas irregulares, entrecortadas irregularmente, formando surcos tenues, dirigidos radialmente al ápice; ápice apenas visible, usualmente erosionado, generalmente presente en la valva II y en individuos juveniles (menores a 6 mm de longitud) (Figuras 21A, B); margen posterior ligeramente dentado, lobulado y más o menos convexo; en las valvas II-III es recto. Valva anal más ancha que larga (2 veces) (Figuras 23A, 24A, B); margen anterior, como en las valvas intermedias; área antero-mucronal amplia, área yugal lisa, hacia la periferia se desarrollan costillas longitudinales, irregulares entrecortadas que se atenúan en la línea diagonal; área postmucronal reducida, deprimida en su parte media, escultura de costillas concéntricas, irregulares, formando surcos sinuosos, finos; mucro elevado post-medio; pendiente postmucronal cóncava. Articulamento corto, blanco; lámina sutural amplia en las valvas cefálica (Figura 23B) y anal, dientes de inserción (Figura 23D), irregulares en anchura, borde de los dientes ligeramente estriados (Figura 23B), no serrados, separados por amplias y hondas hendiduras de inserción; valvas intermedias con apófisis (Figura 23C), cortas, angostas, sub-rectangulares, conectadas por la placa yugal amplia y lisa; dientes de inserción cortos, separados por una hendidura de inserción; los rayos radiales presentes (Figura 23D); borde sólido; formula de las hendiduras 8–10/1/7–8. Cinturón cubierto con

pequeñas escamas (Figura 24C), sub-rectangulares, apicalmente redondeada, con 34–38 surcos longitudinales finos. Rádula (Figura 24D), diente central pequeño, alargado y angosto, que es superado en tamaño por el diente menor lateral que el más ancho y apicalmente seccionado en una proyección lobular apical con un tallo que lo envuelve a manera de vaina (Figura 24E); diente mayor lateral tricúspide, las cúspides presentan el mismo tamaño.

Comentarios taxonómicos

Esta especie fue referida inicialmente como *S. mariposa* para las áreas coralinas de Oaxaca (Reyes-Gómez *et al.*, 2010); y más tarde para las costas rocosas de Guerrero (Flores-Garza *et al.*, 2012), que se consideraron como extensiones de su rango de distribución. La examinación posterior de la micro escultura de las valvas, reveló ser subdesarrollada e incongruente con la de *S. mariposa* del Golfo de California, la cual se caracteriza por presentar un patrón de costillas lobulares, longitudinales en las áreas centrales y de nódulos en las áreas laterales (Reyes-Gómez, 2016). *Stenoplax* sp. se caracteriza por presentar una escultura rugosa, irregular (Figura 21E), la cual se concentra hacia la periferia y se atenúa hacia al centro de las valvas, formando un patrón punteado, o de perforaciones en el tegumento, que desaparece en las áreas yugales.

Stenoplax sp. también fue identificada por Galeana-Rebolledo *et al* (2014) como *Stenoplax rugulata* (Sowerby, 1832), con distribución conocida en Centro América, de Nicaragua a Perú. La revisión del holotipo BMNH198028 (Isla Lobos, Perú) (Figura 30), mostró similitudes en la coloración del tegumento y la forma del cuerpo (alongada oval) con *Stenoplax* sp. Sin embargo, la escultura del tegumento de *S. rugulata* es de costillas lobulosas, continuas, concéntricas en la valva cefálica y la valva anal, y longitudinales en las áreas laterales, que se continúan hacia las áreas pleurales. De la misma forma que en *Stenoplax* sp. las costillas de *S. rugulata* en las áreas plurales se atenúan hacia el área yugal, pero aparecen más sólidas y estas costillas solo se entrecortan cerca del ápice; y la pendiente postmucronal, es ligeramente cóncava, mientras que en *Stenoplax* sp. el área

postmucronal se deprime considerablemente formando un perfil más acentuadamente cóncavo, indicando también lo sobresaliente del mucro (Figura 24A).

Stenoplax rugulata es considerada una especie rara, con registros puntuales en Perú (Kaas y Van Belle, 1990), la comparación morfológica indica que ambas especies están de alguna forma relacionadas pero que se separan por el tipo de escultura del tegumento.

***Stenoplax mariposa* (Bartsch MS. Dall, 1919)**

Figuras 25A–E, 26A–G

Material examinado: Talla máxima 14.2 x 6.8 mm de longitud. 2 individuos, La Paz, B.C.S. (24.3°10'31"N, 110°17'41"O); 1 individuo, Playa La Balandra, La Paz B.C.S. (24°08'32"N, 110°18'39"O), CNMO5817; 3 individuos, Playa El Saladito, La Paz, B.C.S. (24.4°30'10"N, 110.7°27'47"O), CNMO5642; 2 individuos, Calerita, B.C.S., EMU10016; 1 individuo, San Juan de la Costa, B.C.S. (24.38°26'51"N, 110.6°21'43"O), EMU10016-1.

Descripción. Quitones pequeños, forma del cuerpo alongada oval; color del tegumento en individuos vivos es variada, con manchones de varios colores, blanco, marfil o crema, gris, negro, anaranjado, verde olivo (Figuras 25A-B); algunos individuos pueden ser totalmente blancos (Figura 25C) o solo de color verde olivo (Figuras 25D, E); con puntos redondeados azul-turquesa en las áreas centrales de las valvas; estos puntos se pueden fusionar en líneas irregulares (Figuras 25A, B). Valva cefálica semi- circular (Figura 26A), margen posterior en forma de V; muesca amplia y honda; tegumento de escultura de bajo relieve y densa irregular, reticulado concéntricos, que se arreglan en un patrón de finos surcos sin orden aparente que se atenúa hacia el área del ápice; margen posterior fuertemente dentado, con 8–10 dientes. Valvas intermedias (Figura 26B), sub-rectangulares; borde posterior casi recto, fuertemente dentado (10–12); ápice ligeramente pronunciado, generalmente erosionado; áreas laterales ligeramente elevadas, por un patrón de la escultura, semejante al de la valva cefálica, aunque más o menos regular que forma finos surcos radiales; áreas centrales con costillas longitudinales; cerca del área yugal las costillas se dirigen diagonalmente hacia el centro de la valva. Valva anal (Figura 26D) más ancha que larga; área anteromucronal con escultura como en las áreas centrales; mucro elevado; post-medio;

área postmucronal reducida, la escultura es más irregular que en la valva cefálica y áreas laterales; la pendiente post-mucronal es cóncava. Articulamento (Figura 26C), translucido; placa de inserción corta; apófisis (Figuras 26B-D) anchas y cortas, de forma sub-rectangular, conectadas por la placa yugal amplia y lisa; hendiduras de inserción amplias y hondas, con forma de V, dientes cortos y angostos (Figura 26C); fórmula de las hendiduras de inserción 9–10/1/7–10. Cinturón cubierto por escamas (Figura 26E), sub-rectangulares, con 45–50 finos surcos tenues en su superficie. Rádula con diente central corto, angosto, ligeramente cóncavo apicalmente; diente menor lateral como una placa angosta bilobulada hacia su parte anterior y posterior; diente mayor lateral tricúspide.

Comentarios taxonómicos

Stenoplax sp. fue determinada inicialmente como *S. mariposa*, ya que el color del tegumento es similar, y la escultura de las valvas se asemeja en su apariencia. Sin embargo, la comparación minuciosa de la microestructura de ambas especies, muestra que *S. mariposa*, refleja una escultura densa que cubre la totalidad del área de las valvas y el diente central es la mitad de corto y ancho respecto al diente de *Stenoplax* sp. *Stenoplax mariposa* puede presentar cierto grado de erosión en las áreas yugales de las valvas. Sin embargo, el tegumento se mantiene en la mayor parte del área de las valvas. La talla máxima conocida es de 16 mm de longitud. Esta especie es común en la costa oeste del Sur del Golfo de California, hasta el momento no ha sido registrada en otras regiones. Con base en el análisis morfológico, las incongruencias observadas indican que ambas especies corresponden a entidades diferentes.

La examinación del Sintipo (USNM58865) (Figura 29), mostró una escultura del tegumento con tubérculos irregulares y de costillas longitudinales en las áreas centrales. Las valvas mostraron erosión en el área yugal, sin embargo, la escultura cubre la mayor parte del área de las valvas, que dista considerablemente con la sub-escultura observada en *Stenoplax* sp.

Stenoplax limaciformis (Sowerby, 1832)

Figuras 27A–D, 28A–F

Material examinado. Talla máxima 33.3 x 11.3 mm longitud. 8 individuos, Parque de la Reina, Acapulco (16°50'58.2"N, 99°54'01.85"O), CNMO5179; 5 individuos, Parque de la Reina, Muelle, Acapulco (16°50'58.2"N, 99°54'01.85"O), CNMO5188; 17 individuos, Playa Tlacopanocha, Acapulco (16°50'41.5"N, 99°54'25.02"O), CNMO5208; 5 individuos, Playa Manzanillo (16°50'27.9"N, 99°54'38.1"O), CNMO5211; 9 individuos, Playa Majahua, Acapulco (16°50'58.2"N, 99° 54'01.8"O), CNMO5238; 12 individuos, Playa Las Gatas, Zihuatanejo de Azueta (17°37'17.5"N, 101°33'14.2"O), CNMO5254; 3 individuos, Playa Isla Grande, Zihuatanejo de Azueta (17°40'36.8"N, 101°39'16.7"O), CNMO5265; 5 individuos, La Barrita, Petatlán (17°24'32.7"N, 101°10'51.3"O), CNMO5303; 10 individuos, Playa Tlacopanocha, Acapulco (16°50'41.5"N, 99°54'25.02"O), CNMO5310; 6 individuos, Playa Troncones, La Unión (17°47'35"N, 101°44'46.6"O), CNMO5334; 4 individuos, Playa La Angosta, Acapulco (16°60'29.8"N, 99°54'55.7"O), CNMO5830; 8 individuos, Playa La Angosta, Acapulco (16°60'29.8"N, 99°54'55.7"O), CNMO5830; 4 individuos, Playa Manzanillo, Acapulco (16°50'27.9"N, 99°54'38.1"O), CNMO6070.

Descripción. Quitones de talla mediana, forma del cuerpo oval (Figuras 27A–D); color del tegumento en individuos vivos es variable, en tonalidades verde olivo, rosa, gris, café oscuro, crema o café claro; puede presentar manchones irregulares de diferentes colores y tonos, desde claros a oscuros; cinturón con manchones irregulares, verde o café oscuro. Valva cefálica (Figura 28A), con forma circular y alargada; margen posterior en forma de “V”, con una muesca pequeña; escultura de costillas concéntricas al ápice; las costillas hacia la periferia de las valvas están fuertemente entrecortadas, formando un patrón lobular o de reticulado irregulares, las costillas en la parte media de la valva pueden formar un patrón de zigzag, que se atenúa o desaparece hacia la muesca. Valvas intermedias (Figura 28B), con borde anterior convexo, el margen posterior es recto, ápice casi nulo, aunque en individuos poco erosionados se observa un pequeño punto ligeramente pronunciado; áreas laterales (Figuras 28C, D), elevadas, anchas y cortas; la línea diagonal en ángulo de 45°; las costillas contigua al ápice pueden ser longitudinales y un poco entre cortadas o sinuosas inclinándose hacia el margen lateral de la valva (Figura 28C); escultura de las costillas longitudinales de apariencia lobulosa, en la periferia suelen entrecortarse fuertemente formando nódulos irregulares en tamaño y forma (Figura 28D); áreas centrales amplias, con costillas longitudinales que se pueden fusionar en el área yugal. Valva anal más larga que ancha; mucro ligeramente post-medio, poco elevado, indicado por una protuberancia central; área anteromucronal reducida, con forma semi-triangular, con escultura tegumental

igual que en las áreas centrales; área postmucronal con costillas concéntricas al mucro, entrecortadas y erosionadas cerca del mucro. Articulamento grueso, con tonalidades de color rosa y café oscuro; placa de inserción de la valva cefálica y anal ligeramente más ancha que en las valvas intermedias, dientes de inserción separados, hendiduras de inserción amplias y hondas; valvas intermedias con apófisis angostas y alargadas, generalmente con una hendidura de inserción; diente de inserción angosto, corto, muy reducido; fórmula de las hendiduras 9–11/1/9–12; borde sólido; poros radiales pequeños y numerosos. Cinturón cubierto por diminutas escamas semi-curveadas, aproximadamente dos veces más largas que anchas (Figura 28E), con 11–14 costillas delgadas. Rádula (Figura 28F), con diente central muy angosto, alargado a la misma altura que el diente menor lateral; diente mayor lateral tricúspide, las cúspides del mismo tamaño.

Comentarios taxonómicos

Stenoplax limaciformis, reveló diferencias contundentes en la escultura del tegumento y en las escamas del cinturón, además la talla máxima del cuerpo supera considerablemente a *Stenoplax* sp. (4 veces). *Stenoplax limaciformis* se caracteriza por su escultura de costillas nodulosas que se entrecortan y cubren la totalidad del tegumento; así mismo las áreas laterales son considerablemente elevadas y visibles por un cambio en la escultura contigua a la línea diagonal, y las escamas son angostas y alargadas. Por su parte, *Stenoplax* sp. presenta escultura subdesarrollada, con áreas laterales ligeramente elevadas y escamas más cortas. García-Ríos *et al.* (2014), demostró con análisis moleculares que *S. limaciformis* y *S. purpurascens* (Adams, 1845) del Caribe central están emparentadas y consideradas especies hermanas. Inicialmente esta hipótesis, se basó en las afinidades morfológicas de ambas especies, particularmente de la escultura del tegumento y la forma del cuerpo (Bullock, 1985). Esto sugiere que la similitud de caracteres morfológicos puede indicar afinidades taxonómicas entre las especies de quitones. Por lo tanto, es posible decir que las diferencias en el tipo de escultura del tegumento, en la forma del cuerpo y escamas del cinturón de *S. limaciformis* y *Stenoplax* sp. sugieren menor relación taxonómica entre estas especies.

Discusión

El presente trabajo describe las características morfológicas de las especies de dos géneros abundantes de quitones del Pacífico Oriental Tropical, *Callistochiton* y *Stenoplax*. Ambos géneros muestran una importante riqueza específica y variabilidad fenotípica en la región, por lo que son un buen ejemplo de la importancia de realizar estudios taxonómicos comparativos. Aunque existen estudios previos en los que se mencionan estos taxones (Ferreira, 1979; Bullock, 1985; Kaas y Van Belle 1985a, 1985b, 1987, 1990, 1994). Se requiere de mayor detalle en el análisis de su morfología, así como la creación de guías o acervos ilustrados complementadas con imágenes de microscopía electrónica donde se resalta la morfología de sus estructuras.

Los quitones del género *Callistochiton* incluidos en el presente estudio se consideran especies con afinidad tropical, distribuidas en la ecorregión del Sur del Golfo de California (SGC) y en el Pacífico Tropical Mexicano (Reyes-Gómez, 2016). *Callistochiton colimensis*, *C. elenensis* y *C. expressus* presentan una distribución amplia desde el SGC y a lo largo de la Provincia Panámica, hasta Perú y Ecuador. Sin embargo, *C. colimensis* sólo se ha registrado en localidades puntuales del sur del golfo de California, especialmente en Mazatlán, el norte de Nayarit y en un registro aislado en la bahía de Cuastecomates, Jalisco (Ferreira, 1979; Kaas y Van Belle, 1994). Dichos registros, son consistentes con las localidades del material depositado en la colección de referencia del ICMYL, Mazatlán, con lotes de Punta Mita, Nayarit (EMU10021), Punta Chile, Mazatlán (EMU1639). Estos registros sugieren que *C. colimensis* es más común en el SGC que en el Pacífico Tropical. Los atributos de la escultura del tegumento de *C. colimensis* permiten diferenciarla de *C. elenensis*, *C. expressus* y *Callistochiton* sp. en particular por la presencia de costillas surcadas. Sin embargo, el patrón sub-reticulado de las áreas centrales pueden ser a simple vista semejantes en estas especies, mientras que en el caso de *C. expressus* y *Callistochiton* sp. es sub-desarrollado o menos acentuado y que es evidente al observarse en un

microscopio de luz. El tamaño de las pústulas en *C. elenensis* es mayor que en *C. colimensis* en la cual son más bajas y pequeñas.

Las especies del género *Callistochiton* s.s. se diferencian al establecer el número y la constitución de las costillas, que pueden ser surcadas, de pústulas evidentes que dan la apariencia de costillas lisas (Cuadro 1). Con respecto al desarrollo de las pústulas, se observaron especies con diferente grado de elevación, desde aquellas con pústulas elevadas como *C. elenensis* y *C. colimensis*, hasta las que presentan pústulas poco elevadas o casi imperceptibles o que son más evidentes en las áreas laterales y en el área postmucronal de la valva anal como en *C. expressus* y *Callistochiton* sp. Con base en el tipo de la escultura del tegumento (costillas), se observan dos grupos dentro del género *Callistochiton*, el grupo de las especies comunes en el sur del Golfo de California (*C. elenensis* y *C. colimensis*), que se caracterizan por presentar pústulas más grandes dándole la apariencia a las costillas de ser más anchas y elevadas. Y el grupo de las que se distribuyen comúnmente en el Pacífico Tropical Mexicano (*Callistochiton* sp.), y de Centroamérica (*C. expressus*), con pústulas pequeñas que forman costillas menos elevadas y angostas. Dichos grupos, se diferencian por la posición y elevación del mucro y la forma del diente mayor lateral (Cuadro 2), que en el primer grupo (*C. elenensis* y *C. colimensis*) es tricúspide, y en el segundo grupo presentan una sola cúspide en forma de gancho (*C. expressus* y *Callistochiton* sp.).

En el caso de las especies estudiadas del género *Stenoplax* sp., su morfología sugiere que *S. rugulata*, presenta caracteres similares principalmente en la forma del cuerpo, coloración, talla máxima, dientes de la rádula y ornamentación de las escamas del cinturón (Cuadros 3, 4). Sin embargo, la escultura del tegumento las diferencia considerablemente, ya que las costillas de *S. rugulata* son sólidas y continuas desde las áreas laterales hasta las áreas centrales de las valvas mientras que la escultura del tegumento de *Stenoplax* sp. no es definida y se limita en la periferia de las valvas (Cuadro 3). La posición del mucro y el tamaño de las escamas también distingue a ambas especies, en el caso de *Stenoplax* sp. las

escamas son más anchas (dos veces) que *S. rugulata* y el área postmucronal es reducida y mucro en posición post-media. *Stenoplax rugulata*, presenta mucro medio y las escamas del cinturón son pequeñas. Estas características sugieren que ambas especies son taxones distintos, pero que pueden estar relacionadas filogenéticamente. Por otro lado, *S. limaciformis* y *S. mariposa* sugieren una mayor distancia taxonómica respecto a *Stenoplax* sp., ya que ambas presentan una escultura del tegumento fuertemente desarrollada, que cubre la totalidad de las valvas (Cuadros 3, 4). Además, las escamas de *S. limaciformis* y *S. mariposa* son alargadas y más pequeñas (dos veces menores que en *Stenoplax* sp.). *Stenoplax limaciformis* registra tallas máximas del cuerpo dos veces mayor que la de *S. mariposa* y *Stenoplax* sp. (Cuadro 4).

De acuerdo a la taxonomía de la Clase Polyplacophora y con base en la evidencia observada en las especies del Pacífico Oriental y del material tipo, *Stenoplax* sp. y *Callistochiton* sp. representan especies no descritas para la ciencia. Para corroborar y probar la distinción taxonómica de ambas especies, se requiere comprobarlo mediante un análisis de ADN.

En éste estudio se describieron las especies de los géneros *Stenoplax* y *Callistochiton* del Pacífico Tropical Mexicano, incluyendo la microestructura de las valvas, escamas del cinturón y los dientes de la rádula. La información que se generó de este estudio morfológico permitió comparar de una forma más detallada los atributos de cada especie y diferenciarlas. Este tipo de estudios permite contar con acervos fotográficos de las estructuras con importancia taxonómica que además de aportar en el conocimiento del grupo, proporcionan información fiable que minimizan los errores en las identificaciones. Además de que permitió establecer que *Stenoplax* sp. y *Callistochiton* sp. son nuevos taxones para la ciencia.

Referencias

- Bozzola, J. J. y L. D. Russell. 1991. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones and Barlett publishers. USA. 241 p.
- Bullock, R. C. 1985. The *Stenoplax limaciformis* (Sowerby, 1832), species complex in the New World (Mollusca: Polyplacophora: Ischnochitonidae). *The Veliger*, 27(3): 291-307.
- Ferreira, A. J. 1979. The genus *Callistochiton* Dall, 1879 (Mollusca: Polyplacophora) in the eastern Pacific, with the description of a new species. *The Veliger*, 21(4): 444-466.
- Flores-Garza, R., L. Galeana-Rebolledo, A. Reyes-Gómez, S. García Ibáñez, C. Torreblanca-Ramírez, P. Flores-Rodríguez y A. Valdés González. 2012. Polyplacophora species richness, composition and distribution of its community associated with the intertidal rocky substrate in the marine priority region No. 32 in Guerrero, Mexico. *Open Journal of Ecology*, 2(4): 192-201.
- Galeana-Rebolledo, L., R. Flores-Garza, A. Reyes-Gómez, S. García-Ibáñez, P. Flores-Rodríguez, C. Torreblanca-Ramírez y A. Valdés-González. 2014. Species richness and community structure of Class Polyplacophora at the intertidal rocky shore on the marine priority region no. 33, México. *Open Journal of Ecology*, 4(2): 43-52.
- García-Ríos, C. I., M. Álvarez-Ruiz, J. Barraza, A. M. Rivera y C. R. Hasbún. 2003. Los quitones (Mollusca: Polyplacophora) de El Salvador: una guía para la identificación de las especies. Impresos Sea Grant, UPRSG-H-85, Mayagüez, Puerto Rico, 32 p.
- García-Ríos, C., N. Pérez-Pérez; J. Fernández-López y F. Fuentes. 2014. Calibrating the chitons (Mollusca: Polyplacophora) molecular clock with the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase I gene. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49: 193-207.
- Hendrickx, M. E., R. C. Brusca, L. Findley. 2005. A distributional checklist of the Macrofauna of the Gulf of California, México. Part I. Invertebrates. Hendrickx, Brusca y Findley (eds). Arizona-Sonora Desert Museum, Arizona. 429 pp.

- Hendrickx, M. E., R. C. Brusca, M. Cordero y G. R. Ramírez. 2007. Marine and brackish-water molluscan biodiversity in the Gulf of California, México. *Scientia Marina*, 71(4):637-647.
- Holguín-Quñones, O. y A. González-Pedraza. 1994. Moluscos de la franja costera de Michoacán, Colima y Jalisco, México. Dirección de Bibliotecas y Publicaciones, Instituto Politécnico Nacional, 133 pp.
- Irisarri I., D. Eernisse y R. Zardoya. 2014. Molecular phylogeny of Acanthochitonina (Mollusca: Polyplacophora: Chitonida): three new mitochondrial genomes, rearranged gene orders and systematics, *Journal of Natural History*, DOI:10.1080/00222933.2014.963721.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1985a. Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora). Vol. 1. Order Neoloricata: Lepidopleurina. 240 pp., 95 figs., 45 maps. E.J. Brill Backhuys, Leiden. Publisher.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1985b. Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora). Vol. 2. Suborder Ischnochitonina. Ischnochitonidae. Schizoplacinae, Callochitoninae and Lepidochitoninae. 198 pp., 76 figs., 45 maps. E.j. Brill Backhuys, Leiden. Publisher.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1987. Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora). Vol. 3. Suborder Ischnochitonidae. Chaetopleurinae and Ischnochitoninae. Addition to vols. 1 and 2. E.J. Brill Backhuys, Leiden, 301 p.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1990. Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora). Vol. 4. Suborder Ischnochitonina: Ischnochitonidae: Ischnochitoninae. (cont.). Addition to vols. 1, 2 and 3. E.J. Brill Backhuys, Leiden, 298 p.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1994. Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora). Vol. 5. Suborder Ischnochitonina: Ischnochitonidae: Ischnochitoninae (concluded); *Callistoplacinae*; *Mopaliidae*. Addition to vols. 1-4, E.J. Brill Backhuys, Leiden, 402 p.

- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae, Regnum Animale*, ed 10, Vol. I, Vermes, Testacea, Chiton. P. 667. [Photographic facsimile, British Museum of Natural History, 1956.].
- Muller, D. A. y J. Grazul. 2001. Optimizing the environment for sub-0.2nm scanning transmission electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy*, 50:219226.
- Reyes-Gómez, A. y M. A. Salcedo-Vargas. 2002. The Recent Mexican chiton (Mollusca: Polyplacophora) species. *The Festivus, San Diego California*, 34(2): 17-27.
- Reyes-Gómez, A. 2004. Chitons in Mexican Waters. *Bolletino Malacologico, Suppl.* 5: 69-82.
- Reyes-Gómez A., N. A. Barrientos-Lujan, J. Medina-Bautista y S. Ramírez-Luna. 2010. Chitons from the coralline area of Oaxaca, México (Polyplacophora). *Bollettino Malacologico*, 46: 111-125.
- Reyes-Gómez, A. 2016. The Polyplacophora from the Mexican Pacific. *Supplement to The Festivus*, 48: 1-50.
- Robertson, R. 1971. Scanning electron Microscopy of planktonic larval marine gastropod shells. *The Veliger*, 14(1): 1-12
- Sirenko, B. 2006. New Outlook on the system of chitons (Mollusca: Polyplacophora). *Venus*, 65(1-2): 27-49.

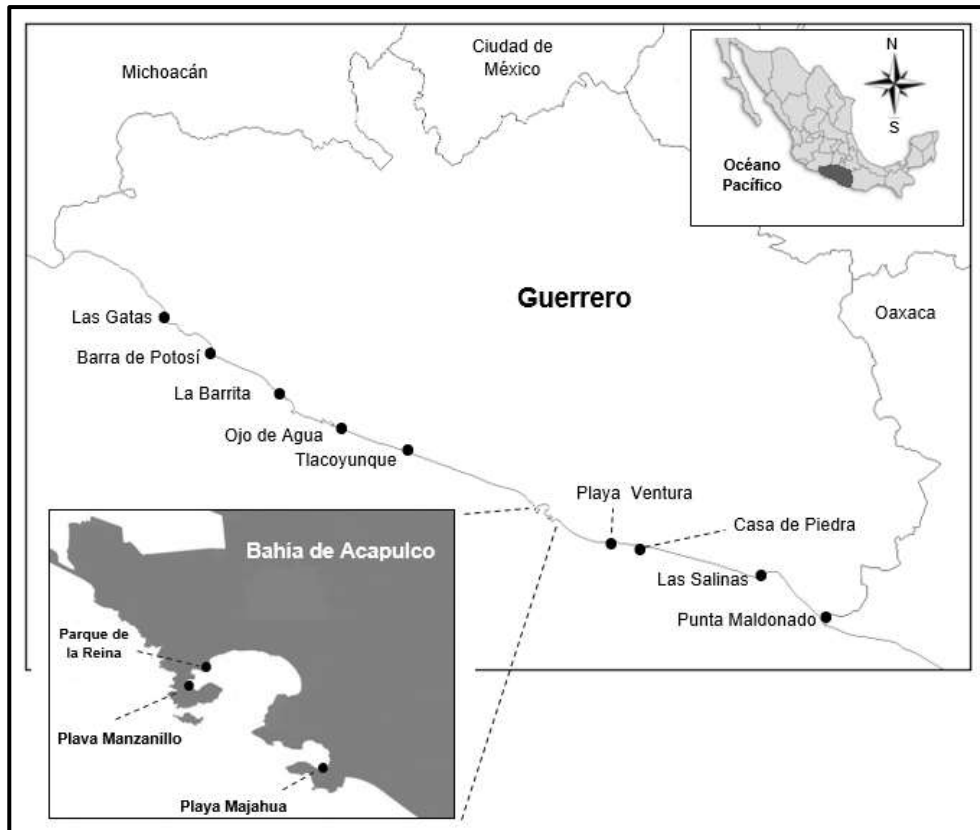


Figura 31. Sitios de procedencia del material examinado de Guerrero, depositado en la Colección Nacional de Moluscos, (CNMO) IBUNAM.

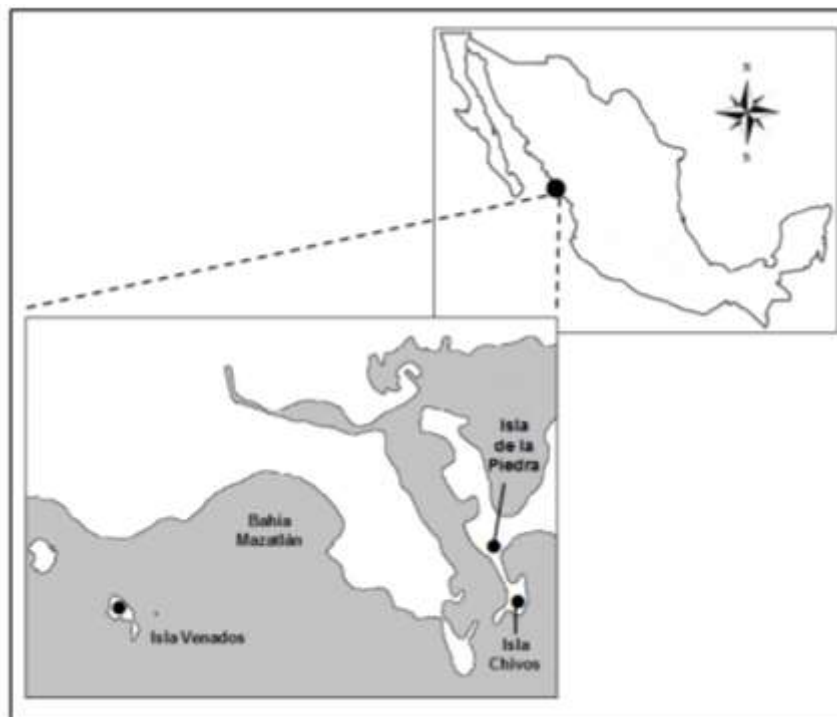


Figura 32. Sitio de muestreo de *Callistochiton colimensis* en la Isla de la Piedra, Mazatlán, Sinaloa.

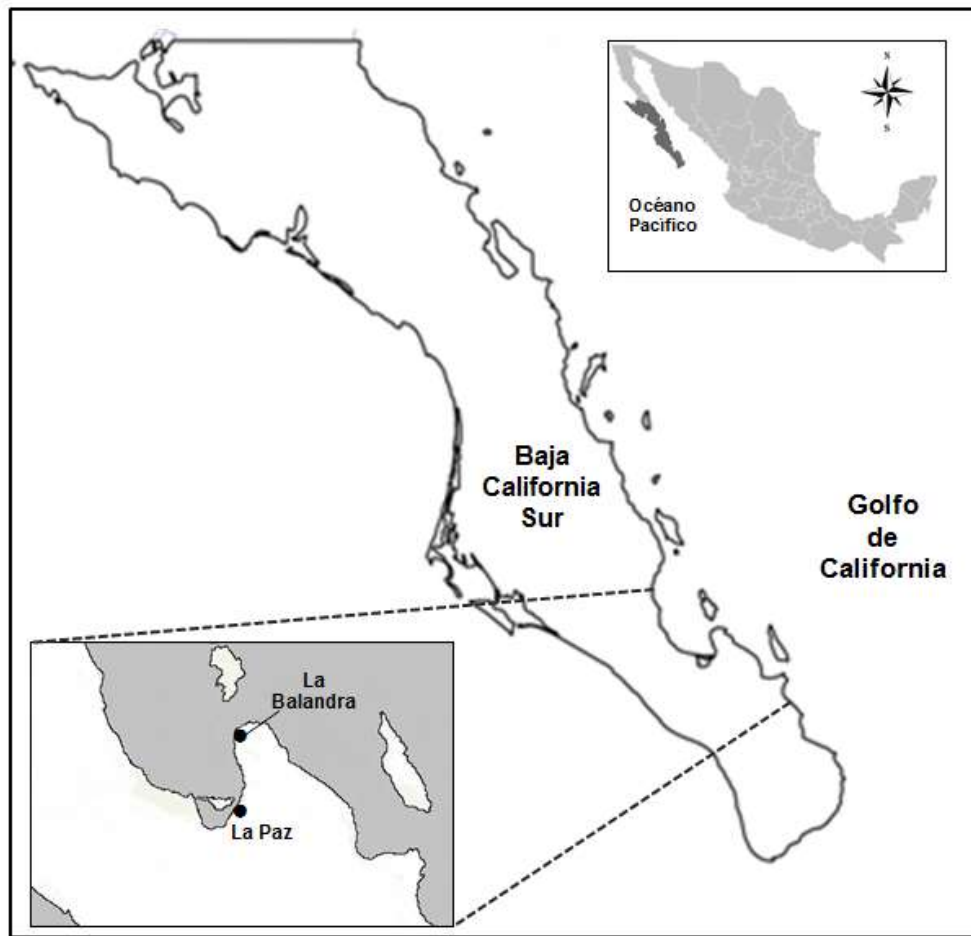


Figura 33. Sitio de procedencia del material examinado y analizado genéticamente de *Stenoplax mariposa* y *Lepidozona serrata* en Baja California Sur.

Apéndice A

Cuadro 1. Caracteres de las valvas y de la escultura del tegumento de las especies del género *Callistochiton*.

Caracter morfológico	<i>Callistochiton elenensis</i>	<i>Callistochiton colimensis</i>	<i>Callistochiton expressus</i>	<i>Callistochiton sp.</i>
Tipo de escultura del tegumento	Costillas y reticular	Costillas bifurcadas y reticular	Costillas y sub-reticulado	Costillas y sub-reticulado
Número de costillas en valva cefálica	12–15	11–13	10–12	11–13
Tipo de pústulas de las costillas	gruesas	gruesas	pequeñas	pequeñas
Número de dientes en el margen posterior de la valva I	8–9	12–14	10–12	8–9
Número de costillas en las áreas laterales	2	2	2	2
Tipo de escultura en las áreas centrales	Reticulado grueso	Reticulado grueso	Sub-reticulado fino	Sub-reticulado fino
Número de costillas longitudinales en cada área pleural	12–15	14	10–12	10–12
Elevación del mucro	Bajo, indicado (casi al nivel del tegumento)	Bajo, indicado (casi al nivel del tegumento)	Ligeramente elevado (aproximadamente 0.5–1 mm)	Ligeramente elevado (aproximadamente 1–2 mm)
Tipo de escultura en el área yugal	Reticulado	Con quilla	Con quilla	Con quilla
Posición del mucro	Antero-medio	Antero-medio	Post-medio	Post-medio
Tipo de pendiente postmucronal	Recto	Recto	Ligeramente cóncavo	Cóncavo
Forme del diente mayor lateral	Tricúspide	Tricúspide	Gancho	Gancho
Forma del diente central	Placa sub-ovalada	Placa apicalmente lobulada	Sub-rectangular, ancho	Placa sub-rectangular, lobulada apicalmente

Cuadro 2. Caracteres del articulamento y los derivados del cinturón de las especies del género *Callistochiton*.

Caracter	<i>Callistochiton elenensis</i>	<i>Callistochiton colimensis</i>	<i>Callistochiton expressus</i>	<i>Callistochiton</i> sp.
Número de hendiduras de inserción en la valva I	8–9	9–10	9–10	9–11
Tipo de placa de inserción de las valvas intermedias	Corta y gruesa	corta y gruesa	Corta, delgada y translúcida	Corta, delgada y translúcida
Forma de las apófisis	Sub-rectangulares y angostas	Sub-rectangulares y angostas	Sub-rectangulares y angostas	Sub-rectangulares y angostas
Número de hendiduras de inserción	1	1	1	1
Rayos de las hendiduras de inserción	Presentes	Presentes	Presentes, casi imperceptibles	Presentes, casi imperceptibles
Tipo de cinturón	Angosto (2–3 mm en individuos adultos)	Mediano (3–4.5 mm en individuos adultos)	Mediano (2.5–3.5 mm en individuos adultos)	Angosto (1.8–2.6 mm en individuos adultos)
Tipo de escamas del cinturón	Sub-ovaladas	Anchas, cortas, sub-rectangulares	Anchas, cortas, sub-rectangulares	Anchas, cortas, sub-rectangulares
Superficie de las escamas del cinturón	Costillas longitudinales gruesas	Costillas longitudinales delgadas	Costillas basales y pequeñas pústulas apicales	Costillas basales y pústulas medianas distales

Cuadro 3. Caracteres de las valvas y de la rádula del género *Stenoplax*.

Caracter	<i>Stenoplax limaciformis</i>	<i>Stenoplax mariposa</i>	<i>Stenoplax rugulata</i>	<i>Stenoplax sp.</i>
Escultura del tegumento	Costillas longitudinales y nódulos	Costillas longitudinales y nódulos irregulares	Costillas longitudinales	Sub-escultura (sub-nódulos)
Tipo de escultura del tegumento de la valva I	Costillas nodulares concéntricas	Nódulos irregulares	Costillas concéntricas	Rugosa, costillas irregulares, entrecortadas (sub-nodular)
Tipo de dentición del margen posterior de la valva I	Ondulado	Dentado (serrado)	Ondulado	Ondulado
Tipo de escultura del tegumento de las áreas laterales	Costillas entre cortadas	Nódulos irregulares	Costillas longitudinales	Rugosa sub-nodular
Tipo de escultura del tegumento de las áreas centrales	Costillas longitudinales	Costillas longitudinales	Costillas longitudinales	Costillas longitudinales, entre-cortadas
Número de costillas en cada área pleural	24–30	18–20	12–15	8–10 en cada área pleural
Cobertura de la escultura de las áreas centrales	Total incluyendo el área yugal	Total incluyendo el área yugal	En las áreas pleurales sin incluir el área yugal.	Hasta la parte media de las áreas pleurales
Posición del mucro	Post medio	Post-medio	Central	Post-medio
Número de costillas en cada área pleural	21–27	15–17	8–10	8–10
Cobertura del tegumento de área postmucronal	Completa incluyendo el área yugal	Completa incluyendo el área yugal	Ausente en el área yugal	Exclusivamente en la periferia
Forma del diente mayor lateral	Tricúspide	Tricúspide	Tricúspide	Tricúspide
Forma del diente central	Delgado y angosto	Angosto y corto	Angosto y alargado	Angosto, espatulado anteriormente

Cuadro 4. Caracteres del articulación y de los derivados del cinturón del género *Stenoplax*.

Caracter	<i>Stenoplax limaciformis</i>	<i>Stenoplax mariposa</i>	<i>Stenoplax rugulata</i>	<i>Stenoplax sp.</i>
Número de hendiduras de inserción en la valva I	9–11	9–10	9	11
Tipo de placa de inserción de las valvas	Ancha	Ancha	Angosta	Angosta
Forma de las apófisis	Semi-triangules, angostas y alargadas	Semi rectangulares, angostas y cortas	Semi-triangules, angostas y cortas	Semi-triangules, angostas y cortas
Número de hendiduras de inserción	1–3	1	1	1
Rayos de las hendiduras de inserción	Presentes, numerosos	Presentes, numerosos	Presentes	Presentes
Anchura del cinturón	Mediano (3–4 mm)	Mediano (3–4 mm)	Angosto (1–2 mm)	Angosto (0.5–1.2 mm)
Tipo de escamas del cinturón	Alargadas	Más anchas que largas (2 veces)	Más anchas que largas (2 veces)	Más anchas que largas (2.5 veces)
Superficie de las escamas del cinturón	Costillas delgadas	Costillas delgadas	Costillas medianas	Costillas finamente delgadas

Cuadro 5. Distribución geográfica y caracteres externos del material tipo de las especies del género *Stenoplax*.

	<i>Stenoplax mariposa</i> <i>Ischnochiton mariposa</i> , Sintipo USNM 58865	<i>Stenoplax rugulata</i> <i>Ischnochiton rugulatus</i> Lectotipo BMNH198028	<i>Stenoplax petaloides</i> <i>Chiton petaloides</i> Holotipo USNM1922	<i>Stenoplax</i> sp.
Distribución Global	Costa Oeste de Baja California, La Paz y Revillagigedo	Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Ecuador y Perú	Endémico de las Islas Hawái	Guerrero
Talla máxima	16 mm	18.3 mm	10 mm	12.90 mm
Tipo de escultura valva I	Sub-nodular	Costillas concéntricas	Corrugada	Sub-escultura
Tipo de escultura áreas centrales	Costillas longitudinales	Costillas longitudinales	Costillas entrecortadas	Sub-escultura
Cobertura de la escultura en las áreas centrales	Presente, incluye el área yugal	Presente área yugal lisa	Presente área yugal lisa	Presente exclusivamente en la periferia área yugal lisa
Tipo de escultura áreas centrales	Costillas	Costillas	Costillas	Costillas
Posición del mucro	Post-medio	Ligeramente post-medio	Central	Post-medio
Pendiente postmucronal	Cóncava	Ligeramente cóncava	Recta	Cóncava

Cuadro 6. Distribución geográfica y caracteres externos del material tipo de las especies del género *Callistochiton*.

	<i>Callistochiton elenensis</i> <i>Chiton elenensis</i> Sintipo USNM 58865	<i>Callistochiton expressus</i> <i>Ischnochiton expressus</i> La Unión, El Salvador	<i>Callistochiton colimensis</i> <i>Ischnochiton colimensis</i> Holotipo ANS 152139	<i>Callistochiton</i> sp.
Distribución Global	Golfo de California a Ecuador	Sinaloa, México a Ecuador	San José del Cabo, B.C.S a Isla Perla, Panamá	Oaxaca y Guerrero
Talla máxima	21 mm	12 mm	24.5 mm	11.2 mm
Tipo de escultura valva I	9 costillas de pústulas medianas	12 costillas de pústulas pequeñas	12 costillas de pústulas gruesas,	12 costillas de pústulas pequeñas
Número de costillas en las áreas laterales	2	2	2	2
Tipo de escultura en las áreas centrales	Reticular	Sub-reticular	Reticular	Sub-reticular
Posición del mucro	Ante-medio	Post-medio	Ante-medio	Post-medio
Pendiente postmucronal	Recto	Ligeramente cóncava	Cóncavo	Cóncava
Cobertura de la escultura del área anteromucronal	Presente, incluye el área yugal	Presente, incluye el área yugal	Presente, incluye el área yugal	Presenta, incluye el área yugal

CAPITULO 2. Caracterización genética de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. de Guerrero

RESUMEN

De acuerdo con el análisis morfológico previo, *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. muestran caracteres distintivos en la escultura del tegumento de las valvas y en la ornamentación de las escamas. Para comprobar a nivel genético la identidad de ambas especies, se obtuvo la secuencia del gen mitocondrial COI. Estudios previos han demostrado que el uso de este gen es eficaz para distinguir especies de poliplacóforos. Se implementó primeramente la metodología conocida para la extracción y amplificación del gen COI. Sin embargo, resultó ser ineficaz ya que el tamaño de la muestra disponible no fue suficiente. La extracción de ADN con el kit comercial QIAGEN fue el más eficaz, se obtuvo ADN con una concentración 47.1–205.3 ng/μl y valores de pureza de 1.89–2.03. La mezcla de reacción y el programa de amplificación se modificaron con respecto a las referencias seguidas para ambos géneros. En el caso de *Callistochiton*, las condiciones óptimas se alcanzaron utilizando Taq Platinum, 1.5μl de MgCl₂ y una temperatura de alineamiento de 46.3°C. Para las especies del género *Stenoplax* la amplificación fue positiva utilizando el Master MIX (multiplex), y una temperatura de alineamiento de 57°C; con la excepción de *S. limaciformis* y de *C. expressus* que amplificaron al añadir DMSO a la mezcla de reacción, reducir la cantidad de Taq Platinum y usar temperaturas de alineamiento entre 45-48°C. *Callistochiton colimensis* no fue exitosa la amplificación del gen COI, se ensayaron PCRs con diferentes condiciones y temperaturas, debido a que el tejido para la extracción ADN fue mínimo (pie de un sólo individuo); por lo que la cantidad y calidad del ADN estuvieron por debajo de los valores que permiten la amplificación del fragmento de interés. El análisis de las secuencias de *Callistochiton* sp., *C. elenensis*, *C. expressus*, *Stenoplax* sp., *S. mariposa*, *S. limaciformis* y *L. serrata* bajo el criterio de máxima verosimilitud reveló dos clados con un soporte del 96%, uno corresponde a *Callistochiton* y otro a *Stenoplax*. Dentro del clado *Callistochiton* se observaron dos clados con un soporte de 74%. El primero está conformado por las especies con escultura del tegumento fuertemente pronunciada con costillas elevadas de pústulas grandes, representado por *C. crassicostatus* y *C. palmulatus*,

especies que se distribuyen en la costa Oeste de Baja California, México. Este grupo aparece como grupo hermano de *C. elenensis*, representado por un individuo de Playa Balandra, La Paz, B.C.S. y uno de Playa Manzanillo, Guerrero. El segundo clado se integró por *C. expressus* y por *Callistochiton* sp. y *Lepidozona serrata*, que se consideró como el grupo externo de ambos géneros analizados. Sin embargo, se agrupó con *Callistochiton* sp. con un 99% de soporte. El clado del género *Stenoplax* se conformó por dos grupos, el primero integró ambos individuos de *S. limaciformis* y el del linaje de *S. mariposa*. En el grupo de *S. limaciformis*, el individuo de Guerrero mostró un mayor número de cambios (representado por el largo de la rama) con respecto a la secuencia del individuo de Costa Rica. En el segundo grupo con soporte del 100%, se agruparon los individuos de *S. mariposa*. Este clado aparece como el grupo hermano de *Stenoplax* sp. de Guerrero (100% soporte). La hipótesis filogenética generada muestra que *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. son entidades diferentes con respecto a las especies del Pacífico Mexicano incluidas en el estudio. *Callistochiton* sp. mostró mayor afinidad en la secuencia del gen COI con *L. serrata* (La Paz, B.C.S.) que con *C. expressus* y *Stenoplax* sp. reveló mayor afinidad con *S. mariposa*. El estudio de la secuencia del gen COI, permitió la identificación de las especies provisionales de Guerrero como dos nuevas entidades no descritas para la región.

Introducción

Las investigaciones biológicas requieren en su fase inicial del establecimiento de las unidades taxonómicas de estudio. La identificación de los individuos, se basa tradicionalmente en los caracteres morfológicos distintivos comunes al taxón de interés. Sin embargo, en ocasiones las identificaciones resultan poco confiables, especialmente en especies con alta variabilidad morfológica o cuando los atributos fenotípicos observados no corresponden a las descripciones del tipo. A finales del siglo XIX, se exploró con intensidad el campo de la genética mediante el uso de técnicas moleculares para reconocer la identidad taxonómica de diferentes grupos de invertebrados. Este nuevo campo de estudio demostró que los datos moleculares proporcionaban información más objetiva que los datos morfológicos de los individuos (Trivedi *et al.*, 2016), permitiendo por ejemplo identificar a las especies crípticas (morfológicamente similares, pero genéticamente

diferentes) que son frecuentes en varios grupos de invertebrados marinos (Zhang y Hewitt, 2003; Piggott *et al.*, 2008). La genómica ha sido definida como el estudio de los genes y su función, la cual tiene por objetivo entender la estructura del genoma, el mapeo de genes y la secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Zou *et al.*, 2011). El avance de la genómica, ha sido posible gracias al desarrollo de una amplia variedad de técnicas y en especial de los marcadores moleculares que han sido utilizados como herramientas generadoras de información genética (Patwardhan *et al.*, 2014). Un marcador se refiere a cualquier molécula de ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido y su variación permite identificar grupos, poblaciones o especies (Zhang y Hewitt, 2003; Dupont *et al.*, 2007; Trivedi *et al.*, 2016).

Los miembros del Phylum Mollusca presentan similitudes morfológicas altas sobre todo en la ornamentación de la concha, por lo que en muchos casos la identificación morfológica a nivel de especie es complicada (Zou *et al.*, 2011). En particular en la Clase Polyplacophora, las identificaciones de las especies y en general en la taxonomía del grupo se basan primordialmente en los caracteres de las valvas y sobre todo en su escultura, que se complementa con la información de la ornamentación de las escamas del perinoto y en la forma de los dientes de la rádula (Kaas y Van Belle, 1985a; Okusu *et al.*, 2003). Al igual que en otros grupos de moluscos, los polioplacóforos llamados comúnmente quitones, muestran variabilidad intra-específica que en repetidas ocasiones ha sido mal interpretada, generando en la historia cronológica de las especies un amplio número de sinonimias (Okusu *et al.*, 2003; Irisarri *et al.*, 2014). En el estudio de la taxonomía de los quitones, el empleo de los marcadores moleculares ha ampliado el entendimiento de su sistemática, y permitido identificar en las especies vivientes dos linajes o subórdenes (Lepidopleurida y Chitonida) (Thiele, 1910), así como las familias que los constituyen (Irisarri *et al.*, 2014). Aunque se ha demostrado la utilidad de los datos moleculares en el estudio de los quitones, pocos son los estudios que han incorporado estas técnicas, la mayoría se basan exclusivamente en los marcadores morfológicos. Sin embargo, la generación de datos tanto moleculares como morfológicos son necesarios para tener un mejor entendimiento de la

clase. Definitivamente, la combinación de evidencia morfológica y genética permite un acercamiento más natural al estudio de la diversidad de los quitones.

ADN mitocondrial (ADNmt)

Diferentes estudios sobre la identidad taxonómica de especies de moluscos marinos han analizado principalmente regiones del ADN mitocondrial (cyt b, ND4, 16S ARNr, COI, D-loop) (Paine *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2016, Trivedi *et al.*, 2016). Aunque el ADNmt contribuye con menos del 1% del genoma total de cada célula, posee una tasa de evolución 5–10 veces más rápida que el ADN nuclear (Zhang y Hewitt, 2013), y tiene una elevada tasa de mutación y fijación (Paine *et al.*, 2007). El genoma mitocondrial es circular, con un tamaño de aproximadamente 16 000 pb (cinco veces más pequeño que el genoma nuclear), y su composición es más simple ya que es haploide y no posee intrones (Veale *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2016).

El uso de genes mitocondriales para la identificación de especies presenta ventajas en el caso de muestras deterioradas durante su procesamiento inicial (Rodríguez *et al.*, 2008; Patwardhan *et al.*, 2014). El ADN mitocondrial además permite que en menor número de generaciones se observen variaciones entre secuencias de especies muy relacionadas, lo que favorece una mejor identificación entre ellas (Dupont *et al.*, 2007; Trivedi *et al.*, 2016).

Gen de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI)

El gen de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa, es uno de los más conservados del genoma mitocondrial. Esta proteína realiza funciones importantes en la respiración celular y la consecuente producción de energía (Avisé, 2004; Dupont *et al.*, 2007; Zhang y Hewitt, 2013). El gen COI presenta regiones conservadas que permiten la identificación (distinción) entre grupos taxonómicos, y su fragmento de 658pb, que funciona como un código de barras (DNA barcoding) que permite identificar a los grupos, poblaciones o especies (Paine *et al.*, 2007). En la actualidad el uso de las secuencias COI es amplio en diferentes grupos de invertebrados, ya que es menos costoso y más sencillo de amplificar que otros marcadores, además se han diseñado iniciadores o “primers” universales que permiten la amplificación de ADNmt de diferentes taxones (Folmer *et al.*, 1994).

El amplio estudio del gen COI en diferentes grupos de animales, ha validado la eficacia, actualmente la secuencia de dicho gen se considera como código de barras de ADN, que ha aportado información minimizando los errores que el estudio de la morfología no puede percibir (Schindel y Miller, 2005; Trivedi *et al.*, 2016). El estudio de este fragmento se ha sugerido como la región de ADN en animales que proporciona resolución a nivel de especie en diferentes taxones (Hebert *et al.*, 2003; Hebert y Gregory, 2005).

Utilidad de las herramientas genéticas en el estudio de la Clase Polyplacophora

Katharina tunicata (Wood, 1815) fue una de las primeras especies de quitones en la que se secuenció el genoma mitocondrial en su totalidad (Boore y Brown 1994), y posteriormente los genomas del género *Sypharochiton* (suborden Chitonina) (Veale *et al.*, 2014). Los estudios posteriores se enfocaron en la re-clasificación de la Clase Polyplacophora en la categoría de orden y suborden (Okusu *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2007; Irisarri *et al.*, 2014). Recientemente la propuesta de un reloj molecular incluyó un grupo de especies crípticas del Pacífico Oriental y del Mar Caribe (García-Ríos *et al.*, 2014) y la descripción de una especie nueva de la región de Florida (García-Ríos, 2015).

Aunque son pocas las contribuciones que integran datos moleculares en el estudio de la Clase Polyplacophora, los resultados han aportado importantemente al conocimiento del grupo. En el caso de la filogenia del suborden Acanthochitonina Bergenhayn, 1930 los resultados moleculares (ADN mitocondrial: *rrnL*, *cox1* y *cob*; y dos genes nucleares 18S y 28S) apoyan la reciente clasificación morfológica de Sirenko (2006) (Okusu *et al.*, 2003; Irisarri *et al.*, 2014), con excepción de Acanthochitonina. Adicionalmente presentan evidencias de convergencia morfológica en el tipo de tegumento de las valvas y en la ornamentación del cinturón de algunas especies. De esta manera, con base en los datos moleculares se re-agruparon los géneros *Lepidochitona*, *Cryptochiton* y *Tonicella*; se revivió el género *Cyanoplax* y se elevó Mopaliidae y Lepidochitonidae a nivel de familia. Finalmente, se re-afirmaron las familias Ischnochitonidae y Chitonidae. Dichas contribuciones han mostrado la importancia de combinar datos genéticos y morfológicos para comprender el origen y evolución de determinados caracteres, así como para evaluar su utilidad filogenética y taxonómica (Irisarri *et al.*, 2014).

Objetivo General

Establecer la identidad taxonómica de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. de Guerrero mediante la secuencia del gen COI.

Objetivos particulares

1. Analizar los caracteres genéticos de la secuencia del gen COI de *C. colimensis*, *C. elenensis*, *C. expressus*, *S. mariposa* y *S. limaciformis*, que coexisten y son similares morfológicamente a *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp.
2. Identificar las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas.

Justificación

De acuerdo al análisis morfológico, las especies provisionales requieren de un refinamiento en su estudio, especialmente *Callistochiton* sp. que presenta una afinidad importante con *C. expressus* y *Stenoplax* sp. con *S. mariposa*. El estudio de la secuencia COI de las especies proporcionará mayor evidencia para establecer la identidad taxonómica de las especies de Guerrero.

Materiales y Métodos

Material biológico

Las muestras analizadas se obtuvieron en el litoral rocoso de Guerrero y en el submareal somero de Mazatlán y el intermareal de La Paz, Baja California Sur (véase Figuras 31–33). Los especímenes de las especies *C. elenensis*, *Callistochiton* sp., *S. limaciformis* y *Stenoplax* sp. de Guerrero se recolectaron en dos localidades: Playa Manzanillo y Playa La Barrita, con base en el reporte de la presencia de las especies hecho por Galeana-Rebolledo *et al.* (2014). Para obtener *S. mariposa* y *L. serrata* que es el grupo hermano del género *Stenoplax* y *Callistochiton* de acuerdo a Irisarri *et al.* (2014), se eligió la localidad de La Paz, B.C.S., con base en los registros de García-Ríos y Álvarez-Ruiz (2007). Y los sitios de colecta para *C. colimensis* y *C. expressus* en Mazatlán se identificaron siguiendo a Ferreira (1979) y Kaas y Van Belle (1994) respectivamente.

Se obtuvieron 10 individuos de *C. elenensis*, *Callistochiton* sp. y *S. limaciformis* el 25 de Febrero del 2015, en el intermareal rocoso (1.5 m) de Playa Manzanillo (16°50' 26.50"N, 99°54' 35.43"O) en el Municipio de Acapulco. Esta localidad cuenta con aproximadamente 64 metros de extensión de playa y se caracteriza por presentar oleaje suave; se compone de rocas de tipo metamórficas y de cantos rodados, con textura de semi-áspera a lisa, sin grietas o fisuras. La segunda localidad de Guerrero fue La Barrita (17°24' 32.74"N, 101°10' 51.36"O), perteneciente al Municipio de Petatlán, localizada en la Costa Grande cerca del poblado "El Cayacal" y al Norte del cerro "La Negra". Esta localidad presenta una extensión de playa rocosa muy corta de aproximadamente 714 m, delimitada al Este por una playa arenosa y al Oeste por acantilados rocosos; se caracteriza por presentar oleaje intenso y se compone de rocas ígneas intrusivas de superficie áspera y agrietada. En La Barrita se obtuvieron 18 individuos adultos de *Stenoplax* sp. en el intermareal y en la zona de rompiente (1.5–2 de profundidad) el 14 de Marzo 2016. En el submareal somero (5 m de profundidad) de la Isla de la Piedra, Mazatlán (23.1°12.3'09"N, 106°27'60"O) se obtuvo 1 individuo de *C. colimensis* y 2 de *Callistochiton* cf. *expressus* el 22 de Octubre del 2016. Esta localidad cuenta con 30 kilómetros cuadrados de superficie y mide aproximadamente 14.5 kilómetros de largo por 2.5 kilómetros de ancho, es una zona arenosa que cuenta con pequeñas extensiones rocosas y se caracteriza por presentar oleaje intenso. En el litoral rocoso (1–2 m de profundidad) de Playa Balandra, La Paz, B.C.S (24°08'32"N, 110°18'39"O), se obtuvieron 10 individuos de *S. mariposa* y 10 de *L. serrata* el 9 de Marzo 2015. Finalmente, se obtuvo 1 individuo de *C. expressus* de La Unión Maculis, El Salvador (CBUPRH2083) en intermareal rocoso, recolectado el 5 de Mayo 2002.

Todos los individuos se fijaron en etanol al 75% entre 2–3 horas después de ser extraídos, 12 horas después se almacenaron en una concentración de etanol al 95% de acuerdo al protocolo de Alonso-Rodríguez (2013), y se mantuvieron en contenedores oscuros para preservar los colores naturales del tegumento.

Extracción de ADN

Se tomó la totalidad del pie de 3–8 individuos de cada especie (*C. elenensis*, *C. colimensis*, *Callistochiton* sp., *S. limaciformis*, *S. mariposa*, *Stenoplax* sp. y *L. serrata*), con excepción

de *C. expressus* de El Salvador del que sólo se contó con 1 individuo para el análisis. La homogeneización del tejido se hizo combinando el método de maceración mecánica con nitrógeno líquido en vial con pistilo.

Para la extracción de ADN se utilizaron dos métodos, el de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB, Doyle y Doyle, 1990) y de kit comercial. Se probó con el kit Wizard Genomic DNA (Promega) y con el kit comercial QIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit). Una vez obtenido el ADN, se determinó la concentración y pureza (260/280) por medio de espectrofotometría. Además, la integridad del ADN se comprobó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con un revelador redgel, para ello se cargaron 3µl de muestra (ADN) y 3µl de azul de bromofenol, la electroforesis se realizó a 100 voltios por 55 min.

La extracción de ADN con el método CTAB mostró valores bajos en la cantidad de ADN total (4.4–16.9 ng/µl), excepto para *S. limaciformis* (172.4 ng/µl). Los valores de pureza (260/280) fueron ligeramente bajos 1.02-1.47. Con el kit PROMEGA la cantidad de ADN fue mayor 3.3–94.1µl y la pureza varió de 1–2.83. Mientras que con el kit QIAGEN se obtuvo mayor cantidad de ADN con 47.1–205.3 ng/µl y de mayor pureza de 1.89–2.03 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Muestra los valores de la lectura del ADN obtenido en la extracción con el kit QIAGEN. GE, corresponde al grupo externo.

Especie	Código de la muestra	Ácidos nucleicos (ng/µl)	Pureza (260/280)
<i>Lepidozona serrata</i> (GE)	LSR	47.1	2.03
<i>Stenoplax limaciformis</i>	SLM	205.3	1.89
<i>Stenoplax mariposa</i>	SMR	89.6	2.06
<i>Stenoplax</i> sp.	SSP	83.7	1.95
<i>Callistochiton</i> sp.	CSP	79	1.94
<i>Callistochiton elenensis</i>	CEL	101.6	1.96
<i>Callistochiton expressus</i>	CEX	72.4	2.05
<i>Callistochiton colimensis</i>	CCL	3.3	0.58

Amplificación del COI mediante PCR

Los cebadores empleados en la amplificación del gen (COI) fueron: Forward: LCO1490, 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'; Reverse: HCO2198, 5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'. Para amplificar el COI de las diferentes especies se requirieron algunos ajustes y modificaciones particulares a la mezcla de reacción y al programa de PCR, debido a diferencias en la cantidad y calidad del ADN, así como requerimientos de cada especie.

Las condiciones iniciales de una primera serie de PCR se hicieron siguiendo la mezcla de reacción y programa señalados por García-Ríos *et al.* (2014) y García-Ríos (2015). Se usó un volumen total de 25µl: 0.5µl de ADN; 0.5µl de cada cebador; 2µl de dNTPs; 5µl buffer; 2.5µl de MgCl₂; 0.25µl de Taq polimerasa y 14µl de H₂O; con el programa del termociclador: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos; 45°C durante 30 segundos; 72°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 1 minuto. En una segunda serie de PCRs se usó Taq Platinum para favorecer la amplificación, ya que bloquea la actividad de la polimerasa a temperatura ambiente, y se activa cuando el ciclo inicia a 94°C. Además, se agregó el reactivo DMSO que facilita la desnaturalización y disminuye la temperatura de alineamiento (T_m) del cebador; el volumen total se ajustó a 20µl y la mezcla de reacción incluyó: DMSO 1µl; H₂O 9µl; buffer 2µl; dNTPs 2µl; cebador F y R 0.5µl; MgCl₂ 2.5µl; Taq Platinum 0.5µl; ADN 2µl. Para las posteriores series de PCRs se usó un Master Mix (Multiplex, que incluye: buffer, dNTPs, MgCl₂, Taq), el cual permite una mayor precisión de acción entre la Taq polimerasa y el co-factor (Bolivar *et al.*, 2014; Song y Yoon, 2013). El volumen de la mezcla de reacción se ajustó a 11µl e incluyó: 3µl de Master MIX (Multiplex); H₂O 3µl; cebador F y R 1µl y 1µl de ADN. En el programa de amplificación la temperatura de alineamiento fue de 57°C. El producto de PCR se comprobó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0.5µl de revelador (redgel), y se comparó con un marcador de 100 pb. En cada pozo se cargaron 3µl del marcador con 3µl de azul de bromofenol, se utilizó el buffer de electroforesis (TBE) y se corrió a 100 voltios por 55 min.

Condiciones óptimas de la PCR

Las condiciones de la PCR se estandarizaron en los gradientes de temperatura de alineación, concentración de MgCl₂ y ADN, además para favorecer la amplificación se usó Taq Platinum y el reactivo DMSO. La cantidad óptima del co-factor (MgCl₂) fue de 2–2.5 µl y la cantidad de ADN varió basándose en la cantidad de aminoácidos y pureza de la muestra (véase Cuadro 1 para las siglas de la muestra): LSR 3µl; SLM 1µl; SMR 1µl; SSP 3µl; CSP 2µl; CEL 2µl; CEX 3µl; CCL 5µl. Las condiciones finales de la PCR fueron: volumen total de 20µl; DMSO 1µl; H₂O 9µl; buffer 2µl; dNTPs 2µl; cebador F y R 0.5µl; MgCl₂ 2.5µl; Taq Platinum 0.5µl; y la temperatura de alineamiento entre 46–48 °C. Bajo estas condiciones la amplificación fue positiva para las especies del género *Callistochiton* y *Lepidozona* con excepción de *C. expressus*. La PCR con el Master MIX (Multiplex) se ajustó a un volumen total de 11µl, las condiciones del MIX fueron: 3µl de Master MIX (Multiplex); H₂O 3µl; cebador F y R 1µl y ADN 1µl, y la temperatura de alineamiento fue de 57°C. La amplificación con este método fue positiva para las especies del género *Stenoplax* y para *C. expressus*. La amplificación para *C. colimensis* fue negativa con ambos protocolos, por lo que se deduce que la baja cantidad de tejido disponible para el análisis afectó el resultado.

Purificación de producto de la PCR y reacción de secuenciación

La purificación consistió de varios pasos, primero se aplicó el tratamiento con exonucleasa II, para degradar los primers residuales y conjuntamente se agrega SAP o fosfatasa alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase), que defosforila los dNTPs sobrantes (Henley *et al.*, 2006; Cornejo *et al.*, 2014). En un vial eppendorf se agregó 20µl del producto de la PCR con 1µl de exonucleasa II y SAP, en condiciones de temperatura de 80°C por 30 minutos. Para el marcaje de los nucleótidos, se realizó una reacción de secuenciación por medio de la PCR, que incluye el reactivo BigDye Terminator V3.1, el cual contiene un coeficiente específico de Taq polimerasa y MgCl₂ y dNTPs/ ddNTPs etiquetados con colorantes fluorescentes (diclororhodamina). La mezcla de reacción incluyó: H₂O 7 µl; buffer BigDye 2µl; cebador F y R 1µl (por separado); ADN 5µl; el programa fue de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos. Para eliminar los restos de reactivos del BigDye

(polimerasa, buffer y cofactor) y de los cebadores, el producto de la reacción de secuenciación se purificó por medio de columnas de gel del kit comercial QIAGEN siguiendo el protocolo del fabricante.

Secuenciación del ADN

Se realizó la secuenciación de Sanger del COI de todas las especies analizadas, excepto de *C. colimensis*. Esta técnica se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Sturm *et al.*, 2006; Geist *et al.*, 2008; Shendure y Ji, 2008). Cada nucleótido (A, T, C, G) emite una particular longitud de onda al pasar por un haz de láser; la señal emitida se recoge en un ordenador y se procesa en forma de picos en un gráfico denominado electroferograma (Lydeard y Lindberg, 2003; Juergen *et al.*, 2008). Una vez obtenidas las secuencias (Cuadro 2) se editaron en formato FASTA y se pusieron a prueba en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) en la opción de BLAST para compararlas con las secuencias existentes en esta base datos e identificar la existencia de contaminación o de similitud con otros taxones. La comprobación de las secuencias obtenidas en la base de datos del GenBank, no reveló contaminación y cada especie se confirmó como parte de la Familia Ischnochitonidae de la Clase Polyplacophora.

Edición y análisis de las secuencias de nucleótidos

Las secuencias obtenidas como electroferograma se exportaron al programa Chromas 2.6.2 (Technelysium Pty Ltd., 1996) y se convirtieron los datos a formato FASTA. Una vez transformados los datos se construyó la matriz de secuencias con el programa PhyDe (Jörn Müller, Kai Müller, Christoph Neinhuis y Dietmar Quandt, 2005). Cada secuencia se editó eliminando los extremos, se conservó aproximadamente el mismo número de nucleótidos y se transformó en formato NEXUS. La alineación de las secuencias se hizo con el programa Seaview (N. Galtier, M. Gouy y C. Gautier, 1996), un editor gráfico de secuencias múltiples; se utilizó el algoritmo MUSCLE y una correlación manual. La matriz de secuencias alineadas se exportó a un formato PHYLIP.

Para inferir las relaciones filogenéticas, se usó la plataforma de CIPRES Science Gateway V. 3.3 (www.phylo.org) y se corrió la estimación de máxima verosimilitud con 1000 repeticiones (bootstrap), recomendada para estudios que se basan en el estudio de caracteres como criterio de optimización (Lydeard y Lindberg, 2003; Geist *et al.*, 2008; Juergen *et al.*, 2008). El árbol se construyó con el programa FigTree versión 1.4.3. (Andrew Rambaut, 2006) y se eligió el árbol consenso para la discusión de este estudio.

Cuadro 2. Muestra la secuencia del gen mitocondrial COI de las especies de quitones analizadas del Pacífico Oriental Tropical.

Especie	Localidad	Secuencia del gen COI obtenido en este estudio
<i>Callistochiton</i> sp.	Playa Manzanillo, Municipio de Acapulco en intermareal rocoso a 1.5 m de profundidad	GCTAGTTGGACAGCTTTAAGATTGTTAATCCGTGCTGAATTAGGACAGCCCGGAGCCT TACTAGGGGACGATCAGCTTTATAATGTTATTGTAAGTCTGTCATGCCTTTGTAATAATT TTTTCTTGGTAATACCTATAATAATTTGGAGGATTGGAAATTGATTGGTCCCCTTAT ATAGGAGCACCAGACATGGCTTTCCACGACTAAATAACATAAGATTCTGATTGCTTC CCCCGACTCTGCCTTCTTGGGATCGGCTGCAGTAGAAAGAGGAGTTGGAACCGGA TGGAAGTATACCCCTCTTGAAGAAACATTGCTCATGCCGGGGCGTCTGTAGACTT AGCTATTTTTCTTACATTAGCTGGAGTTTCTCTATTTTAGGGGCGGTTAATTTTAT TACAACGTTTTTAATATACGATGAAGTGGAAATGCAGATAGAACAATGCCTTTGTTT GTATGATCTGTAATAAATTACTGCAGTCTCTTTTATTATCTTTACAGTGTTAGCAGA GCATTACATATTACTGATCGAAATTTAATACTGC (565 pb)
<i>Callistochiton elenensis</i>	Playa Manzanillo, Municipio de Acapulco en intermareal rocoso a 1.5 m de profundidad.	AATTGAGCTGAGTTAGGACAACCTGGAGCATTATTAGGAGATGATCAACTTTATAAT GTTATTGTACTGCCCCATGCTTTGTAATAATTTTTTTTAGTAATCTATAATAATTG GAGGATTTGGTAAGTACTGTTTCTTTAATATTAGGGCACCAGATAGCAATTTCCAC GCTTAAATAACATAGTTTTGATTACTTCTCTCTGCTTTATGTTTACTCTTAGGTTCCAGC AGCGAAAGAGGAGTTGGAACGGTTGAACGTTTACCCCCATTAGCCAGAAAATTGCT CATGCTGGAGGATCAGTAGATCTAGCAATTTTTTCACTTCACTTAGCTGGAGTTTCTCA TTTTAGGAGCTGTAATTTTACTACTGTTTTAATATACGTTGAAAAGGAATACAAATA GACGTTTACCTTATTGTTGATCGGAAGATGACCGCTATTTTATTTACTATCCTTACC AGTTTTGGCTGGAGGAATTACAATATATTACGGACCGAAATTTAACTGCATTCCTTG AACCTGCGGGGAGGAAACCAATTAAT (565 pb)
<i>Callistochiton expressus</i>	La Unión Maculis, El Salvador (CBUPRH2083) en intermareal rocoso.	CTTTTACTTTAACTTCGTGCTGACTTTTTTCCGGGTGCTTTACTAAGTAAAGATCAAC TTTCTAATGTTATTGTACTGCTCATGCTTTTGTATAATTTCTTTTATGTAATACCTATA ATAATTGGAGGATTTGGAAACTGATTAGTACCCTTATATTAGGTGCGCCCGATAGG CATTCCACGATTAACAATATGAGATTTGATTGCTTCTCCAGCACITTTGCTTCTTT TAGGGTCAGCATCATTGGAAGAGGAGTTGGAACCGGCTGGACTGTATATCCTCCTCT TGCAGTAATATTGCTCATGCCGGGGGATCTGTAGATTTAGCTATTTTTTCTTTACAT TTAGCCGGGGTTTCTTCTATTTTAGGGGCTGTTAATTTTTATTACAACCGTTTTTTA ATATGCGATGAAAGCGGG (435 pb)
<i>Stenoplax</i> sp.	La Barrita, Guerrero, Municipio de Petatlán, en intermareal a 2 m de profundidad.	TTGTAGGACTGCTTTAAGATTATTAATTCGAGCTGAATTGGGACAGCCTGGGGCTCTAC TTGGAGATGACCAATTGTATAATGTAATTGTTACTGCACATGCCTTTGTTATAATTTTT TTTCTGGTTATGCCAAAATAATTTGGGGGATTTGGAAATTGACTGGTTCTTTAATACTAG GGGCGCTGACATAGCTTTTCCCGCTTAAATAATATAAGTTTTGATTATTAGCTCCT GCTTTATGTTTATTATTAGGATCTGCTGCTGTAGAGAGAGGAGTAGGAACTGGATGAA CAGTATATCCTCCACTAGCTAGAAAATTTGCACATAGAGGAGGTGCGGTTGATTGGC TATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGTTTCTTCCATTCTTGGAGCAGTAAATTTTTATTAC AACAGTGTTAATATGCGATGAAAGGGAATACAGTTAGAACGCTTCTCTTTATTTGTAT GATCTGTAATAAATTACAGCAATCTTACTACTCTCTTTACCCTTTTAGCAGGAGGA ATTACAATACTGCTTACTGACCG (554 pb)
<i>Stenoplax mariposa</i>	Playa Balandra, La Paz, B.C.S. en intermareal rocoso 1-2 m de profundidad.	AATTGAGCTGAACTTGGCCAGCCAGGAGCTTCTTGGAGATGATCAGTTATATAAT GTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTTAGTTATACCAATAATAATC GGAGGATTTGGAAATTTGGTGTACCTTTAATATTAGGGGCCCTGACATAGCTTTTCTT CGGTTAAATAATAAAGTTTTGGCTACTCCCGCTGCTTATGCTTATTATTAGGATCT GCTGCTGTAGAAAGAGGGTAGGAAGTGAACAGTCTACCCACCATTAGCTAGA AATATTGCACATGCGGGAAGTGCAGTTGATCTTGTCTTTTTTCTTGCATTTAGCAGG GGTATCTTCTATTCTTGGAGCAGTTAATTTTATTACAACGGTATTAAATATACGGTGAA AGGCATACAGTTAGAACGTTCTCCACTATTTGTATGATCTGTAATAAATTACAGCAGTT TATTACTTCTTTTACCCTTTTAGCAGGAGGAATTACAATATTACTCTGATCGAA ATTTAAACGCTTTTTTGGACCGCTGGGGGAGGAACCAT (568 pb)
<i>Stenoplax limaciformis</i>	Playa Manzanillo, Municipio de Acapulco en intermareal rocoso a 1.5 m de profundidad	TTATCTTTTCTTCTTCTGTAATTGGGACGGCCGGGACTTTTTAGACATGACCAATT GTATAATGTCATTGTTACTGCTCATGCTTTTGGTTATAATTTTTTTTTTGGTTACGCCAAA AATAATTCGGGGTTGGGAAATGATTATTTCTTTAATGTTAGGATCTCTGAAATGG CTTTCCCACCATTAAATAAAAAAAAAAATTTGGTTTTTACCACCCCTTTTGGCTTTT TACAACGGCCCCCCCCGCAAAAAAAGGAGTGGGGACAGGCTGAACGGTTTCCCTCCC TTAACAAAAAATGCACATGCGGGGGGGCAGTGGACTGACAAATTTTGGCTTTAATT TAGCGGGTTTCCCCAATTTTGAACAGTGAATCTTTTACAACCGTTTCAA (406 pb)
<i>Lepidozona serrata</i> (GE)	Playa Balandra, La Paz, B.C.S. en intermareal rocoso 1-2 m de profundidad.	AATCCGTGCTGAATTAGGACAGCCCGGAGCCTTACTAGGGGACGATCAGCTTTATAAT GTTATTGTAAGTCTCATGCTTTGTAATAATTTTTTCTTGGTAATACCTATAATAATT GGAGGATTTGGAAATTTGTTGGTCCCTTATATTAGGAGCACAGACATGGCTTTTCC ACGACTAAATAACATAAGATTCTGATTGCTTCCCCCGCACTCTGCTTCTTCTGGGAT CGTGCAGAGAAAGAGGAGTTGGAACCGGATGGACAGTATACCCCTCTTGAAGAA ACATTGCTCATGCGGGGGCTGTAGACTTAGCTATTTTTTCTTACATTTAGCTGGA GTTTCTCTATTTTAGGGGCGGTTAATTTTATTACAACGTTTTTAAATATACGATGAAGT GGAATGCAGATAGAACAATGCCTTTGTTTGTATGATCTGTAATAAATTACTGCAGTCC TTCTTTTATATCTTTACCAGTGTAGCAGGAGGAATTACAATTTATTAACTGATCGAA ATTTACTGCTTTTTTGGACCCCGCTGGAGGAGGGGA (567 pb)

Para robustecer el análisis comparativo se incluyeron secuencias (gen COI) de la base de datos del Gen Bank, de especies pertenecientes a ambos géneros (*Callistochiton* y *Stenoplax*) de otras regiones del Pacífico Oriental (Cuadro 3). Se eligió al género *Lepidozonia* como el grupo externo, que con base en datos moleculares (18S, 28S, 16S, COI Y H3) se considera el grupo hermano de *Callistochiton* y *Stenoplax* (Okusu *et al.*, 2003; Irisarri *et al.*, 2014).

Cuadro 3. Lista de especies incluidas en el análisis de las secuencias del gen COI tomadas del GenBank, incluyendo su número de acceso en la base de datos; se indica la región de procedencia y el estudio donde fue considerada la secuencia inicialmente.

Especie	Localidad de procedencia	No. de acceso o ID GenBank
<i>Lepidozonia pectinulata</i> (GE)	Pacífico Norte, Oregón (Kelly <i>et al.</i> , 2007)	EF200956
<i>Lepidozonia mertensii</i> (GE)	Pacífico Norte, California, EUA (Okusu <i>et al.</i> , 2003)	AY377710
<i>Lepidozonia radians</i> (GE)	Pacífico Norte, Washington, EUA (Kelly <i>et al.</i> , 2007)	EF200961
<i>Stenoplax limaciformis</i>	Costa Rica (García-Ríos <i>et al.</i> , 2014)	KC669561
<i>Stenoplax mariposa</i>	Pacífico Norte, Golfo de California (Kelly <i>et al.</i> , 2007)	EF201014
<i>Stenoplax mariposa</i>	Pacífico Norte, California, EUA (Kelly <i>et al.</i> , 2007)	EF201015
<i>Stenoplax mariposa</i>	Pacífico Norte, California, EUA (Kelly <i>et al.</i> , 2007)	EF201016
<i>Callistochiton crassicosatus</i>	Pacífico Norte, Oregón, EUA (Kelly <i>et al.</i> , 2007)	EF200764
<i>Callistochiton palmulatus</i>	Pacífico Norte, Washington, EUA (Kelly <i>et al.</i> , 2007)	EF200783

Resultados

Descripción de la hipótesis filogenética

Se obtuvieron las secuencias del gen COI de siete especies (*Callistochiton* sp., *C. elenensis*, *C. expressus*, *Stenoplax* sp., *S. limaciformis*, *S. mariposa*, *L. serrata*), con una longitud de entre 406 a 568 pb (Cuadro 2). El árbol consenso del análisis filogenético (máxima verosimilitud, 1000 repeticiones) y enraizado con *Lepidozonia* como grupo externo (Figura 1), generó un cladograma en el que se encuentran dos especies en la base del árbol. *Lepidozonia mertensii*, aparece como la especie que enraizó el árbol, mientras que *L. pectinulata* aparece como no resuelta o sin relación con respecto a los dos clados principales del árbol (A y B). Al interior del árbol se reveló en primera instancia que los datos moleculares identifican a las especies pertenecientes a *Callistochiton* y *Stenoplax*, que a su vez se distinguen como dos clados separados, con un soporte de 96%.

El primer clado (A) (59% de soporte) se conformó por dos grupos; en el primero se incluyen las especies del género *Callistochiton* (*C. palmulatus*, *C. crassicosatus*, *C. elenensis*) que se distribuyen desde Washington, EUA hasta Baja California Sur (Ferreira, 1978, 1979; Stebbins y Eernisse, 2009; García-Ríos y Álvarez-Ruiz, 2007). Excepto por *C. elenensis* que llega hasta en el litoral rocoso de Guerrero (Galeana-Rebolledo *et al.*, 2014). El segundo clado con un soporte del 99%, muestra a *Lepidozonia serrata* (Playa Balandra, B.C.S.) como parte del taxón conformado por *Callistochiton* sp., es decir, se comportan como individuos de la misma especie. El análisis detallado de las secuencias de ambos taxones (Cuadro 4), mostró una similitud importante, con cambios mínimos, sin embargo para establecer a *L. serrata* como miembro de *Callistochiton* sp., se requiere incluir a un mayor número de individuos y observar su comportamiento en el árbol filogenético. Por el momento con base en estos resultados *L. serrata* se considera como una especie igual a *Callistochiton* sp. de Guerrero.

Callistochiton expressus por su parte, se anidó con este grupo (*Callistochiton* sp. y *L. serrata*), y se comportó como una especie con mayor divergencia de estos (representado por la longitud de la rama). Con base en este resultado se acepta la hipótesis de que *C.*

expressus presentaría mayor afinidad genética con *Callistochiton* sp. con base en las similitudes morfológicas.

Cuadro 4. Comparación de similitud de las secuencias de *Callistochiton* sp. (1) y *Lepidozona serrata* (2), se indican en negritas y subrayados los cambios en cada una de ellas.

1

GCTAGTTGGACAGCTTTAAGATTGTTAATCCGTGCTGAATTAGGACAGCCCGGAGCCTTACTAGGGGACGATCACT
TATAATGTTATTGTAAGTCTCATGCCTTTGTAATAATTTTTCTTGGTAATACCTATAATAATTGGAGGATTTGGAAATT
GATTGGTCCCTCTTAT**ATA**GGAGCACCAGACATGGCTTTCCACGACTAAATAACATAAGATTCTGATTGCTTCCCCGCA
CTCTGCCTTCTTCTGGGATCG**GCTGCAGT**AGAAAAGAGGAGTTGGAACCGGATGG**AA**GTATACCCCTCTTGCAAGAA
CATTGCTCATGCCGGGGCGTCTGTAGACTTAGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGTTTCTCTATTTTAGGGGCGGTT
AATTTTATTACAAGTTTTTAATATACGATGAAGTGAATGCAGATAGAACGAATGCCTTTGTTTGTATGATCTGTAAAA
ATTACTGCAGTCCCTCTTTTA**TTA**TCTTTACCAGTGTTAGCA**GAGC**ATTAC**TA**TTATTACTGATCGAAATTT**TAATACT**
GC

2

AATCCGTGCTGAATTAGGACAGCCCGGAGCCTTACTAGGGGACGATCAGCTTTATAATGTTATTGTAAGTCTCATGCCTT
TGTAATAATTTTTCTTGGTAATACCTATAATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTGGTCCCTCTTAT**ATTA**GGAGCACC
AGACATGGCTTTCCACGACTAAATAACATAAGATTCTGATTGCTTCCCC**CG**CACTCTGCCTTCTTGGGATCG**TGCA**
GAGAAAAGAGGAGTTGGAACCGGATGG**ACA**GTATACCCCTCTTGCAAGAAACATTGCTCATGCCGGGGCGTCTGTAGA
CTTAGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGTTTCTCTATTTTAGGGGCGGTTAATTTTATTACAAGTTTTTAATATAC
GATGAAGTGAATGCAGATAGAACGAATGCCTTTGTTTGTATGATCTGTAAAAATTACTGCAGTCCCTCTTTTA**TAT**TCTTT
ACCAGTGTTAGCA**GGAGGA**ATTACA**ATA**TTA**TTA**ACTGATCGAAATTT**ATA**CTGC**TTTTTTTTGACCCCGCTGGA**
GGAGGGGA

En el segundo clado (B), las especies del género *Stenoplax* se agruparon con *Lepidozona radians* del Pacífico norte con un soporte del 59%. En este clado se distinguen 3 grupos, el primero de ellos, en la base se encuentran *Stenoplax mariposa* y *Stenoplax* sp. en el que se establecen como especies hermanas con un soporte del 100%. El segundo grupo se conformó por las especies de *S. limaciformis*, mostrando que el individuo de Playa Manzanillo, Guerrero presentó mayor divergencia (representado por la longitud de la rama) con respecto al espécimen de Costa Rica; y en el tercer grupo y más alejado de los otros dos clados se encuentra *L. radians*.

Hipótesis filogenética

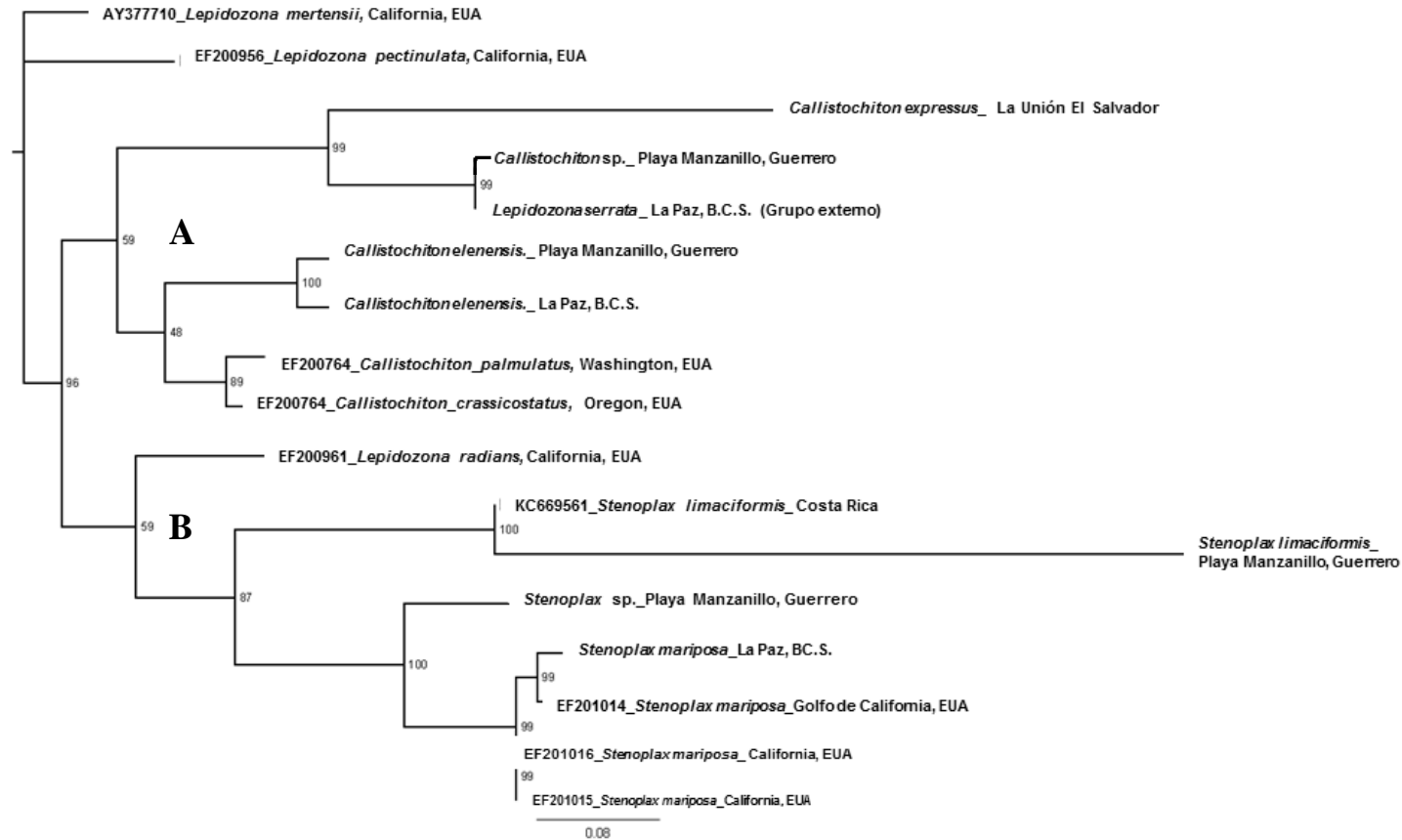


Figura 1. Árbol consenso del análisis de máxima verosimilitud con 1000 repeticiones de las secuencias del gen COI de las especies analizadas de los géneros *Callistochiton* y *Stenoplax* del Pacífico Oriental Tropical. El análisis incluye secuencias de especies pertenecientes a ambos géneros tomadas del Gen Bank, se indican por el número de acceso que inicia con letras mayúsculas seguidas por números (accession number).

Discusión

El análisis filogenético confirmó la pertenencia de *Callistochiton* sp. al género *Callistochiton* y que es un taxón diferente con respecto a las especies estudiadas. Al interior del árbol, además se conformó el clado conformado por *C. expressus* como grupo hermano de *Callistochiton* sp. y *L. serrata*; las cuales aparentemente representan un mismo taxón (99% de soporte). Esta relación sugiere primero, que *L. serrata*, (originalmente seleccionado como el grupo externo de *Callistochiton* y *Stenoplax*), presenta mayor afinidad con el género *Callistochiton* y segundo se comporta como parte del taxón de *Callistochiton* sp. de Guerrero, es decir, que son la misma especie.

El análisis detallado de ambas secuencias (*Callistochiton* sp. y *L. serrata*) mostró similitudes importantes con unos cuantos cambios en su secuencia. Dicho resultado sugiere que *L. serrata* requiere de un estudio más detallado en el que se considere un mayor número de individuos y observar su comportamiento. Además, este resultado apoya la hipótesis propuesta por varios autores (Ferreira, 1978; Stebbins y Eernisse, 2009) de excluir a *L. serrata* de *Lepidozona*, ya que en general se ha considerado que esta especie presenta más diferencias morfológicas que similitudes con el género *Lepidozona*. Sin embargo, hasta ahora no existía evidencia suficiente para proponer una posible re-clasificación. Morfológicamente *Callistochiton* sp. y *L. serrata* son similares en la longitud del cuerpo (hasta 12 mm), en el articulamento (apófisis y lamina sutural), así como en el diente mayor lateral en forma de gancho y en la posición del mucro ligeramente post-medio.

En general las especies del género *Lepidozona* mostraron afinidades con otros géneros, en el caso de *L. radians* mostró similitudes con el grupo *Stenoplax* (59% de soporte). Mientras que *L. mertensii* se comportó como grupo externo enraizando el árbol, mientras que *L. pectinulata* se aisló de los clados A y B y de las especies de *Lepidozona*, apareciendo en el árbol en una posición no resuelta (véase Figura 1). Este comportamiento, sugiere que es necesaria una revisión integral del género *Lepidozona* donde se incluyan a todas las especies conocidas y re-finan su posición taxonómica. Por el momento la elección de considerar a

este género como grupo hermano de *Stenoplax* y *Callistochiton*, aquí se muestra como poco confiable.

El clado del género *Stenoplax* mostró mayores valores de soporte, con excepción del nodo formado por *L. radians* del Pacífico norte con 59% de soporte, lo que se considera como un taxón menos similar o menormente relacionado (lejano) a *Stenoplax*. Al interior del grupo *Stenoplax* sp. se comporta como un taxón relacionado, pero diferente a *S. mariposa* (de La Paz, B.C.S. y de California, E.U.A.), cumpliéndose la hipótesis de que con base en la morfología de la escultura de las valvas *Stenoplax* sp. es una especie nueva para la ciencia.

De acuerdo con este resultado se acepta la hipótesis de que *Stenoplax* sp. de Guerrero difiere de *S. limaciformis* con base en el tipo de escultura del tegumento, forma de las escamas del cinturón y del diente menor lateral. Mientras que el segundo clado apoya la hipótesis de que *Stenoplax* sp. muestra mayores similitudes con *S. mariposa*; sin embargo, se distinguen como taxones diferentes por el tipo de la escultura del tegumento. Además, la conformación del grupo de *S. mariposa* mostró un agrupamiento distintivo en el que los individuos del Golfo de California se distinguen ligeramente de los especímenes del Pacífico norte. Este comportamiento puede sugerir que entre poblaciones hay diferencias considerables, que sólo estudios futuros con mayor número de individuos podría explicar.

El análisis de las secuencias del gen COI demostró ser un buen marcador, el cual permitió caracterizar a las especies de Guerrero (*Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp.) estableciéndolas como especies relacionadas genéticamente a las especies conocidas del Pacífico Oriental Tropical, pero que se distinguen como entidades únicas y que pueden considerarse nuevas para la ciencia.

Referencias

- Alonso-Domínguez, A. 2013. Diversidad Genética y Morfometría de *Fissurella virescens* en el Pacífico Oriental Tropical. Tesis de Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México 96 p.
- Avise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, 361 p.
- Bolívar, A. M., A. Rojas, P. García-Lugo. 2014. PCR y PCR-Múltiplex: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avances en Biomedicina Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica Mérida-Venezuela, 3(1): 25-33.
- Boore, J. L. y W. M. Brown. 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. Genetics, 138: 423–443.
- Cornejo, A., A. Serrato, B. Rendón, M.G. Rocha-Munive. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, Editors, 275 p.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13–15.
- Dundass, N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. Journal of Molecular Diagnostics, 10: 311-316.
- Dupont, S., K. Wilson, M. Obst, H. Skold, H. Nakamo y M. C. Thorndyke. 2007. Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. Marine Ecology Progress Series, 332: 257–273.
- Duvall, M. R., G. H. Learn Jr., L. E. Eguiarte y M. T Clegg. 1993. Phylogenetic analysis of rbcL sequences identifies *Acorus calamus* as the primal extant monocotyledon. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90: 4641-4644.
- Eguiarte, L. E., V. Souza, J. Nuñez-Farfán y B. Hernández-Baños. 1997. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 60: 169-181.

- Ferreira, A. J. 1978. The Genus *Lepidozona* (Mollusca: Polyplacophora) in the Temperate Eastern Pacific, Baja California to Alaska, with the description of a new species. *The Veliger*, 20(1): 19-44.
- Ferreira, A. J. 1979. The genus *Callistochiton* Dall, 1879 (Mollusca: Polyplacophora) in the eastern Pacific, with the description of a new species. *The Veliger*, 21(4): 444- 466.
- Flores-Garza, R., L. Galeana-Rebolledo, A. Reyes-Gómez, S. García-Ibáñez, C. Torreblanca-Ramírez, P. Flores-Rodríguez y A. Valdés-González. 2012. Polyplacophora species richness, composition and distribution of its community associated with the intertidal rocky substrate in the marine priority region No. 32 in Guerrero, Mexico. *Open Journal of Ecology*, 2(4): 192-201.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Galeana-Rebolledo, L., R. Flores-Garza, A. Reyes-Gómez, S. García-Ibáñez, P. Flores-Rodríguez, C. Torreblanca-Ramírez y A. Valdés-González. 2014. Species richness and community structure of Class Polyplacophora at the intertidal rocky shore on the marine priority region no. 33, México. *Open Journal of Ecology*, 4(2): 43-52.
- García-Ríos, C. I., y M. Álvarez-Ruiz. 2007. Comunidades de quitones (Mollusca: Polyplacophora) de la Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. *Revista de Biología Tropical*, 55(1): 177-182.
- García-Ríos, C. I., M. Álvarez-Ruiz, J. E. Barraza, A. M. Rivera y C. R. Hasbún. 2007. Quitones (Mollusca: Polyplacophora) de El Salvador, América Central. *Revista de Biología Tropical*, 55(1): 171-176.
- García-Ríos, C., N. Pérez-Pérez; J. Fernández-López y F. Fuentes. 2014. Calibrating the chitons (Mollusca: Polyplacophora) molecular clock with the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase I gene. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49: 193-207.
- García-Ríos, C. 2015. Nueva especie del quitón *Lepidochitona* (Polyplacophora: Ischnochitonidae) de Puerto Rico. *Revista de Biología Tropical*, 58(2): 635-644.

- Geist, J., H. Wunderlich y R. Kuehn. 2008. Use of mollusk shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies*, 74(4): 337-343. doi:10.1093/mollus/eyn025
- González, N., Rodríguez, N., Torres, W., O'Callaghan, J. y R. De Jesús, 2011. Protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de tejido de oreja del ratón y la rata, usando la enzima bromelina. *Revista Científica*, 11(3): 233-238
- Hebert, P. D., A. Cywinska, S. L. Ball y J. R. De Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings British Society*, 270: 313–322.
- Hebert, P. D. y T. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5): 853-859.
- Henley, W. F., P. J. Grobler y R. J. Neves. 2006. Non-invasive method to obtain DNA from freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Shellfish Research*, 25: 975–977.
- Hillis, D. M., J. J. Bull, M. E. White, M. R. Badgett y J. J. Molineux. 1992. Experimental phylogenetics: generation of a known phylogeny. *Science*, 255: 589-592.
- Hillis, D. M., J.P. Huelsenbeck y C.W. Cunningham. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*, 264: 671-677.
- Hudson, M. E. 2008. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources*, 8: 3–17.
- Irisarri, I., D. J. Eernisse y R. Zardoya. 2014. Molecular phylogeny of Acanthochitonina (Mollusca: Polyplacophora: Chitonida): three new mitochondrial genomes, rearranged gene orders and systematics, *Journal of Natural History*. DOI:10.1080/00222933.2014.963721.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1985. *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*. Vol. 1. Order Neoloricata: Lepidopleurina. E.J. Brill Backhuys, Leiden, Publisher, 240 p.
- Kaas, P. y R. A. Van Belle. 1994. *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*. Vol. 5. Suborder Ischnochitonina: Ischnochitonidae: Ischnochitoninae (concluded); *Callistoplacinae*; *Mopaliidae*. Addition to vols. 1-4, E.J. Brill Backhuys, Leiden, 402 p.

- Kelly R. P., I. N. Sarkar, D. J. Eernisse y R. Desalle. 2007. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). *Molecular Ecology Notes*, 7: 177–183. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01641.x
- Kim, J. 1993. Improving the accuracy of phylogenetic estimation by combining different methods. *Systematic Biology*, 42: 331-340.
- Lydeard, C. y D. R. Lindberg. 2003. *Molecular systematics and phylogeography of molluscs*. Smithsonian Books, Washington and London, 329 p.
- Okusu, A., E. Schwabe, D. J. Eernisse y G. Giribet. 2003. Towards a phylogeny of chitons (Mollusca: Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(4): 281-302.
- Paine, M., J. Mc. Dowell y J. Graves. 2007. Specific identification of Western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bulletin of Marine Science*, 80(2): 353-367
- Patwardhan A., S. Ray, A. Roy. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies A Review. *J Phylogenetics and Evolutionary Biology*, 2: 131. doi:10.4172/2329-9002.1000131
- Piggott, M. P., S. C. Banks, P. Tung y L. B. Beheregaray. 2008. Genetic evidence for different scales of connectivity in a marine mollusc. *Marine Ecology Progress Series*, (365): 127–136, doi: 10.3354/meps07478
- Reyes-Gómez, A. 2016. The Polyplacophora from the Mexican Pacific. Supplement to *The Festivus*, 48: 1-50.
- Rodríguez, L. A., R. Y. Rodríguez, S. C. Reyes, C. J. Tello y B. R. Zamora. 2008. Identificación de Moluscos de Interés Comercial con Análisis de DNA en Yucatán, México. *60th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 2: 541-546.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 145 p.
- Schindel, D. E. y S. E. Miller. 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435: 17.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers, just a matter of fashion *Nature Reviews*, 5: 63-69.

- Sun, S., Q. Li, L. Kong, H. Yu X. Zheng, R. Yu, L. Dai, Y. Sun, J. Chen, J. Liu, J. Ni, L. Yanwei, F. Zhenzhen, S. Zou y J. Lin. 2016. DNA barcoding reveal patterns of species diversity among northwestern Pacific molluscs. *Scientific Reports*, 1: 1-17. | 6:33367 DOI: 10.1038/srep33367
- Shendure, J. y H. Ji. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26: 1135-1145.
- Song, Y. J., J. M. Yoon. 2013. Genetic differences of three *Pollicipes mitella* populations identified by PCR analysis. *Development Reproduction*, 17: 199-205.
- Stebbins, T. D. y D. J. Eernisse. 2009. Chitons (Mollusca: Polyplacophora) known from benthic monitoring programs in the Southern California Bight. *The Festivus*, 41: 53-100.
- Trivedi, S., A. A. Aloufi, A. Abid, K. A. Sankar y S. K. Ghosh. 2016. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 161–171
- Veale, J. A., L. Williams, P. Tsai, V. Thakur y S. Lavery. 2014. The complete mitochondrial genomes of two chiton species (*Sypharochiton pelliserpentis* and *Sypharochiton sinclairi*) obtained using Illumina next generation sequencing. *Mitochondrial DNA*, 27(1): 537-538. DOI: 10.3109/19401736.2014.905846
- Zhang, D. y G. M. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology*, 12: 563–584.
- Zou, S. M., Q. Li, L. F. Kong, H. Yu y X. D. Zheng. 2011. Comparing the usefulness of distance, monophyly and character-based DNA barcoding methods in species identification: a case study of Neogastropoda, *PLoSone* 6, e26619

Discusión General

Durante el presente estudio, *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. fueron examinadas detalladamente mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB) y de microscopía multifocal de las que se generaron fotografías de alta definición resaltando sus atributos morfológicos. Las imágenes mostraron evidencia morfológica y permitieron un análisis comparativo más fino, revelando que ambas especies se distinguen de los taxones previamente registrados en el Pacífico Oriental Tropical. *Callistochiton* sp. se comparó con *C. elenensis*, *C. colimensis* y *C. expressus*, que son especies con un amplio rango de distribución, incluyendo el Pacífico Mexicano desde Baja California Sur y Mazatlán hasta Panamá y Ecuador (Kaas y Van Belle, 1994; Reyes-Gómez, 2016). La examinación de la escultura del tegumento de las especies estudiadas reveló el desarrollo de dos tipos principales de costillas (Apéndice A, Cuadros 1, 2), que por sus características clasifican también a este clado en dos grupos; 1) especies con costillas en las áreas radiales constituidas por pústulas grandes, gruesas y elevadas, con ornamentación reticulada en las áreas centrales; 2) especies con costillas de pústulas pequeñas, angostas y poco elevadas (generalmente erosionadas), con sub-retículas en las áreas centrales. En el grupo 1 se encuentran *C. elenensis* y *C. colimensis* que son especies típicas y comunes de la región del sur del Golfo de California (comprende desde Guaymas a Cabo Corrientes, Jalisco y a Cabo San Lucas, Baja California Sur) distribuyéndose hasta Panamá y Ecuador respectivamente, y que además alcanzan una longitud del cuerpo máxima de 20 mm. En el grupo 2 se clasifican *C. expressus* con un amplio rango de distribución (Mazatlán a Ecuador), y *Callistochiton* sp. restringida para las costas de Guerrero, ambas con una talla máxima de longitud del cuerpo de 12 mm.

En el caso de las especies estudiadas del género *Stenoplax* mostraron elementos únicos que las distingue y que las discrimina entre sí (Apéndice A, Cuadros 2, 3). *Stenoplax limaciformis* registrada de Mazatlán a Perú, fue la especie que reveló mayor número de elementos taxonómicos diferentes con respecto a *Stenoplax* sp., entre los que destacan su talla máxima 33 mm y la escultura del tegumento que es extremadamente desarrollada y

acentuada. El patrón del color del tegumento fue similar en *S. mariposa* y *Stenoplax* sp. Además, *S. mariposa* presenta escultura nodular y costillas longitudinales en la totalidad del área de las valvas, y se encuentra restringida para la región de Baja California Sur. Por otro lado, *Stenoplax* sp. se caracteriza por presentar una sub-escultura (costillas irregulares entrecortadas) que se concentra en la periferia de las valvas y alcanza una talla máxima de 12 mm de longitud; no obstante, los adultos presentan comúnmente 9-10.8 mm de longitud del cuerpo.

Las especies del grupo 1 mostraron mayores diferencias con respecto a *Callistochiton* sp., mientras que *C. expressus* presentó afinidades en la escultura del tegumento, forma y tamaño del cuerpo. La comparación con el material tipo (Panamá) reveló que *C. expressus* presenta menor número de costillas con 10–12 en la valva cefálica y en las áreas pleurales de las valvas intermedias de 6–8, mientras que *Callistochiton* sp. tiene de 11–13 costillas en la valva cefálica (que se bifurcan parcialmente hacia la periferia), y en las áreas laterales las costillas van de 10–12 en cada área pleural. El carácter que distingue a ambas especies, es la ornamentación de las escamas del cinturón, que en *C. expressus* se describe de alrededor de 27 costillas longitudinales (Kaas y Van Belle, 1994); y *Callistochiton* sp. presenta una ornamentación bimórfica, de costillas longitudinales basales que se continúan hacia su parte apical con esferas más o menos elevadas. Sin embargo, la examinación (MEB) de las escamas de un individuo de *C. expressus* de El Salvador, reveló una ornamentación similar a la de *Callistochiton* sp. con costillas basales que se entrecortan hacia la parte apical de la escama en corpúsculos esféricos redondeados menos elevados y la parte apical de las escamas es plano, mientras que en *Callistochiton* sp. la parte apical se curva, dándole un perfil convexo. La valva cefálica de *Callistochiton* sp. presenta de 12–14 costillas radiales, las cuales generalmente se bifurcan hacia la periferia de la valva, mientras que la de *C. expressus* presenta 10–12 costillas sin reportes de bifurcación.

El uso del código de barras permitió la discriminación de *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. así como estableció las relaciones de parentesco con las otras especies del Pacífico Oriental Tropical. El análisis genético también corroboró la identidad de los géneros estudiados, con excepción de *Lepidozona* que mostró afinidades en los clados de *Callistochiton* y

Stenoplax, lo que sugiere que este género requiere de un estudio más minucioso de sus especies para esclarecer su estatus.

La taxonomía morfológica permitió establecer hipótesis que se confirmaron con el estudio del gen COI, como lo fue la afinidad entre *Callistochiton* sp. vs *C. expressus* y *Stenoplax* sp. vs *S. mariposa*. En el caso de las especies del Pacífico norte se agruparon morfológicamente por la conformación de las costillas (gruesas y elevadas) que pueden bifurcarse en la periferia, así como la longitud del cuerpo que va de 15–25 mm. Las especies del Pacífico Tropical Mexicano y aquellas que se distribuyen hacia el sur se caracterizaron por el tamaño de las pústulas (pequeñas no elevadas) y el tipo de escultura reticular de las áreas laterales. Aunque *C. colimensis* no se le incluyó en el estudio genético, es posible establecer, con base en su tipo de escultura, dientes de la rádula y escamas del cinturón, que puede ser genéticamente similar a *C. palmulatus*, *C. crassicostatus* y *C. elenensis* y mayormente diferente a *C. expressus* y *Callistochiton* sp. Los atributos morfológicos permitieron establecer ciertas relaciones de parentesco y en el caso de las especies provisionales, permitió identificarlas como entidades diferentes. Sin embargo, no fue posible establecer con exactitud relaciones filogenéticas entre las especies o con el grupo externo. Los resultados obtenidos en el análisis del gen COI muestran que el estudio de la taxonomía morfológica aunque no es exacta, permite aún discriminar a las especies y que el uso de un grupo de caracteres puede identificar a los clados. En el caso de los quitones se comprobó que el estudio del tipo de escultura del tegumento, dientes de la rádula y la ornamentación de los derivados del cinturón son los adecuados para abordar la taxonomía del grupo. La conjunción del estudio de datos morfológicos y genéticos permitió un mejor entendimiento de la biodiversidad de los poliplacóforos, en este estudio como en otros se comprobó su utilidad y aportó información sobre las relaciones entre las especies, además de que permitió establecer a *Callistochiton* sp. y *Stenoplax* sp. como dos especies nuevas para la ciencia. Finalmente, se mostró al género *Lepidozona* como un grupo parafilético, el cual de acuerdo a este resultado requiere de una revisión profunda en su clasificación actual.

Apéndice B

1. Protocolo de Extracción de ADN técnica CTAB (Alonso-Domínguez, 2013).

1. Coloque y macere 1-2 mm de tejido en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 300µl de 2X CTAB buffer precalentado a 60°C.
2. Encubar en baño maría a 60°C por 30 minutos.
3. Agregue 300µl de Cloroformo-Isoamil alcohol (96:4) y agite por 2 minutos.
4. Centrifugue a 15 000g por 10 minutos.
5. Tome la parte acuosa y repita el paso 3 y 4.
6. En tubos de eppendorf nuevos agregue 600 µl de Isopropanol frío, 25µl 3M NAOAC y la parte acuosa de la extracción. Mezcle por inversión.
7. Centrifugue a 15 000g por 10 minutos
8. Tire el ETOH y re-suspenda el pellet en ETOH al 70%.
9. Centrifugue a 15 000 por 5 minutos.
10. Tire el ETOH y deje el tubo al aire libre para que se seque por 40 minutos.
11. Re-suspenda el pellet en 25µl de 0.1X TE y deje los tubos en un refrigerador a 4°C toda la noche.
12. Verifique la calidad y la cantidad de la muestra.

2X CTAB buffer

100 mM Tris-HCl, pH 8.0

1.4 M NaCl

20 mM EDTA

2% Hexadecyltrimethylammonio bromido (CTAB)

2% Polyvinylpyrrolidone (40,000 MW)

0.2% 2-mercaptoethanol (agregar al final).

2. Protocolo de Extracción de ADN Kit Wizard Genomic DNA (Promega).

1. Tomar el volumen necesario de la solución de lisis de acuerdo al número de muestras y enfriar en hielo.
2. Moler 10-20 mg de tejido con nitrógeno líquido.
3. Agregar 600µl de solución de lisis.
4. Incubar el lisado a 65°C por 15-30 min.
5. Agregar 3µ de RNAsa y mezclar por inversión 2-5 veces.
6. Incubar la mezcla 15-30 min
7. Dejar la muestra tome la temperatura ambiente por 5 min.
8. A temperatura ambiente, agregar 200µl de solución de precipitación de proteínas, mezclar en vortex vigorosamente
9. Enfriar muestra en hielo por 5min.
10. Centrifugar 4 min a 13000-16000 rpm a temperatura ambiente; la proteína precipitada formará un pallet blanco.
11. Rescatar sobrenadante que contiene el ADN en un tubo nuevo de 1.5 ml.
12. Agregar 600µl de isopropanol a temperatura ambiente.
13. Mezclar suavemente por inversión hasta que se formen las hebras de ADN.
14. Centrifugar por 1 min a 13000-16000 rpm a temperatura ambiente, la fase se observará como un pellet blanco.
15. Decantar el isopropanol.
16. Agregar 600µl de etanol al 70% a temperatura ambiente.
17. Centrifugar por 1min a 13000-16000 rpm a temperatura ambiente.
18. Eliminar el etanol por pipeteo.
19. Secar el pellet.
20. Agregar 100µl de solución re-hidratante e incubar 1 hora a 65°C, mezclando la solución periódicamente.
21. Almacenar el ADN a 2-8 °C.

3. Protocolo de Extracción de ADN Kit QIAGEN.

- A. Preparar el termo-baño antes de la extracción a 56°C, para llevar acabo el paso 3.
- B. Preparar el termo-baño antes de la extracción a 70°C, para llevar acabo el paso 5.
- C. Si el buffer ATL o Al, se precipitó, disolver incubando a 56°C.

1. Moler la muestra en nitrógeno líquido, transferir a un tubo de 1.5 ml y agregar 180µl de buffer.
2. Agregar 20µl de proteinasa K, mezclar por vortex e incubar a 56°C de 1-3 horas (se puede quedar por más de 12 horas).
3. Centrifugar ligeramente para bajar las gotas de las paredes.
4. Agregar 200µl de buffer AL, mezclar con un pulso en vortex por 15 segundos e incubar a 70°C, durante 10 min, centrifugar ligeramente al terminar.
5. Agregar 200µl de etanol al 100% o a 96% a la muestra y mezclar en vortex 15 segundos. Centrifugar ligeramente.
6. Colocar la columna Qiamp en el tubo colector y transferir a la columna la muestra obtenida en el paso 5.
7. Cerrar la columna y centrifugar a 8000 rpm durante 60 segundos.
8. Colocar la columna en el tubo colector de 2 ml que viene en la caja y desechar la anterior.
9. Abrir la columna con cuidado y agregar 500µl de buffer AW1, cerrar y centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
10. Colocar la columna en un tubo colector nuevo, descartar el anterior.
11. Cuidadosamente abrir la columna y agregar 500µl de buffer AW2 sin mojar el borde.
12. Cerrar la columna y centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.
13. Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y descartar el tubo colector anterior.
14. Abrir cuidadosamente la columna y agregar 200µl de buffer AE. Incubar a temperatura ambiente, durante 1 min y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
15. Repetir el paso 14.
16. Almacenar el ADN 2-8 °C