



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**“TAXONOMÍA DE ASCIDIAS (TUNICATA: ASCIDIACEA) ASOCIADAS
A ECOSISTEMAS CORALINOS DEL PACÍFICO MEXICANO:
MORFOLOGÍA Y CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

BIOLOGÍA MARINA

**PRESENTA:
ADA LILIANA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

TUTOR PRINCIPAL

**DR. JOSÉ ANTONIO CRUZ BARRAZA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD MAZATLÁN**

COMITÉ TUTOR:

**DR. JUAN JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD MAZATLÁN
DR. ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD MAZATLÁN
DR. ENRIQUE ÁVILA TORRES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD EL CARMEN
DR. FRANCISCO SOLÍS MARÍN
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, CU**

CD. MX., ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**“TAXONOMÍA DE ASCIDIAS (TUNICATA: ASCIDIACEA)
ASOCIADAS A ECOSISTEMAS CORALINOS DEL PACÍFICO
MEXICANO: MORFOLOGÍA Y CÓDIGOS DE BARRAS DE
ADN”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA:
ADA LILIANA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JOSÉ ANTONIO CRUZ BARRAZA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD MAZATLÁN

COMITÉ TUTOR:

DR. JUAN JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD MAZATLÁN
DR. ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD MAZATLÁN
DR. ENRIQUE ÁVILA TORRES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD EL CARMEN
DR. FRANCISCO SOLÍS MARÍN
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, CU

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2019

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por brindarme la oportunidad de pertenecer a dicha institución y desarrollarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento recibido durante la formación de mis estudios de maestría.

A los proyectos: “Taxonomía y sistemática integrativa de invertebrados marinos de México, esponjas y tunicados: bases para la elaboración de códigos de barras de ADN”. Financiado por PAPIIT-Ia201614 y “Nuevas aportaciones a la biodiversidad de esponjas marinas de México: bases para la elaboración de códigos de barras de ADN”. Financiado por CONABIO-JF193.

A los miembros del comité: Dr. José Antonio Cruz Barraza, Dr. Enrique Ávila, Dr. Francisco Solís, Dr. José Luis Carballo, Dr. Alberto Abreu, por sus opiniones y consejos.

Al Laboratorio de Sistemática y Ecología Molecular (SEM), por brindarme las herramientas necesarias para poder desarrollar mi trabajo de investigación.

Al responsable del laboratorio SEM y tutor principal, al Doctor José Antonio Cruz Barraza, por creer y confiar en mí para desarrollar dicho proyecto, por toda su atención y compromiso con mi trabajo, por todo su apoyo, consejos y aportaciones.

Al laboratorio de Invertebrados bentónicos (poliquetos y copépodos) por darme un espacio muy grato y facilitarme las herramientas necesarias para trabajar en la revisión del material biológico. A los responsables de dicho laboratorio: la Doctora Nuria Méndez, por su atención, entusiasmo y valiosa amistad. En especial, al Doctor Samuel Gómez Noguera por “adoptarme” en su laboratorio, por siempre mostrarse interesado en mi trabajo, por brindarme todo su apoyo facilitándome su material y equipo, pero principalmente por sus buenos consejos y recomendaciones.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Al laboratorio de genética, al responsable el Doctor Abreu Grobois y su técnico la M.C. María de los Ángeles Herrera, por todo su apoyo en la elaboración de reactivos y facilitarme algunas herramientas necesarias para llevar a cabo la parte molecular.

Al laboratorio de Ecología del Bentos, al responsable el Doctor José Luis Carballo Cenizo, por facilitarme el material perteneciente a su colección y por sus consejos, los cuales fueron fundamentales para mejorar el presente trabajo. Al Doctor Benjamín Yáñez, por su disponibilidad para auxiliarme en el uso de equipos y su apoyo en algunos de los sitios de colecta.

A mi familia por acompañarme en cada una de mis metas. En especial a mi madre, por su ejemplo de superación, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mis estudios.

A todos los compañeros con los que en algún momento compartí el laboratorio y de alguna u otra forma apoyaron de manera indirecta en el desarrollo de los análisis moleculares, en especial a: Adrián Flores, Manuel Salas, Kenia Zañudo, Misha Hernández, Luz Botero, Cristian Pacheco y Lucy Alarcón, quienes me compartieron sus conocimientos y apoyo, los cuales se quedaron plasmados en este trabajo. Mientras que, yo a ustedes los llevo conmigo a donde vaya, ya que se convirtieron en mi segunda familia y muy buenos amigos. Sin duda alguna, sin su entusiasmo y alegría no hubiera sido posible culminar de manera emotiva mi tesis.

A mis compañeros de posgrado que siempre aportaron un punto de vista favorable y que de alguna manera también se involucraron en mi proyecto: A Yosahandy Vázquez, por su inmenso apoyo en la revisión del material y comprensión de la terminología. A Daniel Colín por su interés, atención y apoyo en la elaboración del mapa. A Ivonne Vega y Andrea Colio, por sus largas charlas académicas, las cuales siempre fueron muy productivas. A José Carlos y Ana Luna por compartir largos ratos académicos. Al señor Medardo por instruirme en el mundo de la ciencia, compartirme todos sus conocimientos y sabiduría. A los romanos (Daniel Solorzano, Alfonso “che”, Carlitos Obregón y

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

nuevamente Adrián Flores), por formar parte de mis días y convertirse en una segunda familia. A todos ustedes, muchas gracias por su valiosa amistad, un placer coincidir en el mismo camino.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

DEDICATORIA:

A mí madre

INDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vi
ÍNDICE DE LÁMINAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	7
2.1 Historia taxonómica de las ascidias.....	7
2.2 Revisión del conocimiento faunístico de ascidias en el Pacífico Oriental Tropical (POT)	8
2.3 Revisión del conocimiento de estudios de ascidias asociadas a ecosistemas coralinos	12
2.4 Marcadores moleculares y taxonomía de ascidias	12
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
V. ÁREA DE ESTUDIO	16
5.1 Selección de las localidades de colecta	17
5.2 Características biológicas del área de estudio.....	20

VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Procedencia del material examinado	21
6.2 Obtención de las muestras	21
6.3 Base de datos y catálogo fotográfico	21
6.4 Preparación de las muestras	22
6.5 Análisis morfológicos	22
6.5.1 Descripción de las especies	23
6.6 Análisis con marcadores moleculares	25
6.6.1 Extracción, amplificación y secuenciación de los fragmentos de ADN	25
6.6.2 Análisis de las secuencias	25
VII. RESULTADOS	28
7.1 Resultados morfológicos	28
7.1.1 Listado faunístico de las especies de ascidias asociadas a arrecifes de coral del Pacífico mexicano	29
7.1.2 Descripción morfológica de las especies	32
7.2 Resultados moleculares	132
7.2.1 Extracción de ADN.....	132
7.2.2 Amplificación del marcador mitocondrial (COI)	132
7.2.3 Análisis de las secuencias	134
7.2.4 Alineamiento y análisis del locus mitocondrial (COI).....	138
7.2.5 Análisis filogenético.....	138
VIII. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIONES	145
8.1 Taxonómicas	145
8.1.2 Problemática en la taxonomía de la clase Ascidiacea	148
8.3 Biodiversidad de la clase Ascidiacea en el Pacífico mexicano.....	151

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

8.2 Moleculares	155
8.2.1 Estandarización de los protocolos empleados para el análisis molecular...	155
8.2.3 Códigos de barras de ADN	155
8.2.4 Sistemática molecular del grupo	157
IX. CONCLUSIONES	160
9.1 Taxonómicas	160
9.2 Moleculares	160
9.3 Otras.....	161
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
XI. ANEXOS.....	172
Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN genómico.	172
Anexo 2. Protocolo de purificación de productos de PCR.	173
Anexo 3. Secuenciación de productos de PCR	173

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Registro de ascidias del POT (trabajos publicados).	11
Tabla 2. Distribución de las comunidades coralinas en el Pacífico Mexicano (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998).	17
Tabla 3. Sitios de colecta y su ubicación geográfica.	19
Tabla 4. Comparación de las principales características entre las especies del género, presentes en las costas del Pacífico mexicano: <i>Didemnum</i> sp.1, <i>Didemnum</i> af. <i>recurvatum</i> y <i>Didemnum vanderhorsti</i>	56
Tabla 5. Comparación de características entre el género <i>Eudistoma</i> sp.1, sp.2, sp.3 y sp.4.	73
Tabla 6. Características de los reactivos empleados en la PCR.	133
Tabla 7. Condiciones de termociclado.	133
Tabla 8. Temperatura de los cebadores.	133
Tabla 9. Resultados moleculares simplificados.	136
Tabla 10. Distancias genéticas entre las especies del género <i>Cystodytes</i> (agrupación G1).	142
Tabla 11. Distancias genéticas entre las especies del género <i>Trididemnum</i> (agrupación G2).	142
Tabla 12. Distancias genéticas entre las especies del género <i>Didemnum</i> (agrupación G4).	143
Tabla 13. Distancias genéticas entre géneros.	144
Tabla 14. Comparación entre cuatro familias del orden Phlebobranchia: Diazonidae, Didemnidae, Polycitoridae y Polyclinidae.	145
Tabla 15. Comparación entre dos géneros de la familia Diazonidae: <i>Diazona</i> y <i>Rhopalaea</i>	146
Tabla 16. Comparación entre dos géneros correspondientes a la familia Polycitoridae: <i>Eudistoma</i> y <i>Cystodytes</i>	146
Tabla 17. Comparación entre tres géneros correspondientes a la familia Ascidiidae: <i>Ascidia</i> , <i>Ascidiella</i> y <i>Phallusia</i>	147

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 18. Comparación entre dos familias pertenecientes al orden Stolidobrancha: Styelidae y Pyuridae.....	148
Tabla 19. Comparación entre cuatro géneros pertenecientes a la familia Styelidae: <i>Styela</i> , <i>Pyura</i> , <i>Microcosmus</i> y <i>Metandrocarpa</i>	148

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Mapa del Pacífico mexicano señalando la distribución de las comunidades coralinas (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998).....	16
Ilustración 2. Localidades de colecta: A) Baja California Sur, B) Sinaloa; C) Nayarit, D) Jalisco, E) Guerrero y F) Oaxaca.	18
Ilustración 3. Análisis simplificado de los análisis morfológicos.	23
Ilustración 4. Esquema simplificado de los análisis moleculares.....	27
Ilustración 5. Especies: 1. <i>Diazona</i> aff. <i>carcosa</i> , 2. <i>Rhopalaea abdominalis</i> , 3. <i>Rhopalaea birkelandi</i> , 4. <i>Didemnum</i> sp., 5. <i>Didemnum</i> aff. <i>recurvatum</i> , 6. <i>Didemnum vanderhorsti</i> , 7. <i>Trididemnum savignii</i> , 8. <i>Eudistoma</i> sp.1, 9. <i>Eudistoma</i> sp. 2, 10. <i>Eudistoma</i> sp. 3, 11. <i>Eudistoma</i> sp. 4, 12. <i>Cystodytes</i> aff. <i>lobatus</i> , 13. <i>Aplidium</i> sp., 14. <i>Ascidia ceratodes</i> , 15. <i>Ascidia sideralis</i> , 16. <i>Ascidia</i> cf. <i>sydnei</i> , 17. <i>Ascidia liberata</i> , 18. <i>Phallusia</i> af. <i>mammillata</i> , 19. <i>Phallusia</i> aff. <i>nigra</i> , 20. <i>Microcosmus exasperatus</i> , 21. <i>Pyura haustor</i> , 22. <i>Pyura lignosa</i> , 23. <i>Pyura</i> sp., 24. <i>Pyura</i> aff. <i>squamulosa</i> , 25. <i>Pyura stolonifera</i> , 26. <i>Metandrocarpa</i> cf. <i>michaelseni</i> , 27. <i>Styela canopus</i>	28
Ilustración 6. Distribución geográfica de <i>Diazona</i> aff. <i>carcosa</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	33
Ilustración 7. Distribución geográfica de <i>Rhopalaea abdominalis</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	38
Ilustración 8. Distribución geográfica de <i>Rhopalaea birkelandi</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	42
Ilustración 9. Distribución geográfica de <i>Didemnum</i> sp. en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	45
Ilustración 10. Distribución geográfica de <i>Didemnum</i> aff. <i>recurvatum</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	49
Ilustración 11. Distribución geográfica de <i>Didemnum vanderhorsti</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	53
Ilustración 12. Distribución geográfica de <i>Trididemnum savignii</i> . en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	58

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Ilustración 13. Distribución geográfica de <i>Eudistoma</i> sp.1 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	62
Ilustración 14. Distribución geográfica de <i>Eudistoma</i> sp.2 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	65
Ilustración 15. Distribución geográfica de <i>Eudistoma</i> sp. 3 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	68
Ilustración 16. Distribución geográfica de <i>Eudistoma</i> sp.4 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	71
Ilustración 17. Distribución geográfica de <i>Cystodytes</i> aff. <i>lobatus</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	76
Ilustración 18. Distribución geográfica de <i>Aplidium</i> sp. en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	79
Ilustración 19. Distribución geográfica de <i>Ascidia ceratodes</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	83
Ilustración 20. Distribución geográfica de <i>Ascidia liberata</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	88
Ilustración 21. Distribución geográfica de <i>Ascidia sideralis</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	91
Ilustración 22. Distribución geográfica de <i>Ascidia</i> cf. <i>sydneiensis</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	95
Ilustración 23. Distribución geográfica de <i>Phallusia</i> aff. <i>mammillata</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	98
Ilustración 24. <i>Phallusia</i> aff. <i>mammillata</i> (Cuvier, 1815).....	99
Ilustración 25. Distribución geográfica de <i>Phallusia</i> aff. <i>nigra</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	101
Ilustración 26. Distribución geográfica de <i>Pyura</i> aff. <i>squamulosa</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	119
Ilustración 27. <i>Pyura</i> aff. <i>squamulosa</i> (Alder, 1863).....	120
Ilustración 28. Distribución geográfica de <i>Pyura stolonifera</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	123

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Ilustración 29. Distribución geográfica de <i>Metandrocarpa</i> cf. <i>michaelseni</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	126
Ilustración 30. Distribución geográfica de <i>Styela canopus</i> en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.	129
Ilustración 31. Electroforesis en gel de agarosa: extracciones de ADN de algunas ascidias.	132
Ilustración 32. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la concentración de productos PCR obtenidos de la amplificación del fragmento del gen COI.	134
Ilustración 33. Cromatograma de la secuencias de ADN de <i>Cystodytes</i> aff. <i>lobatus</i>	135
Ilustración 35. Alineamiento de las secuencias: Sitios conservados.	138
Ilustración 36. Árbol de máxima verosimilitud correspondiente al fragmento mitocondrial COI. Los cuadros representan las agrupaciones y las barras verticales los órdenes en los cuales se divide la clase Ascidiacea.	140
Ilustración 37. Representación filogenética de las agrupaciones G1 y G2.	141
Ilustración 38. Representación filogenética de la agrupación G3.	142
Ilustración 39. Representación filogenética de la agrupación G4.	143
Ilustración 40. Porcentaje de especies por orden: a) Tomado de Shenkar y Swalla (2011); b) Presente estudio.	151
Ilustración 41. Número de especies por familia (presente estudio).	152
Ilustración 42. Número de especies por familia (Shenkar y Swalla, 2011).	153
Ilustración 43. Número de especies por género (presente estudio).	154

ÍNDICE DE LÁMINAS

- Lámina 1.** *Diazona* aff. *carnea* Monniot y Monniot, 1996: A) Musculatura; B) Individuo con túnica; C) Individuo sin túnica; D) Sifones; E) Tentáculos orales; F) Individuo disectado; G) Vasos longitudinales; H) Área abdominal; I) Gónadas. 35
- Lámina 2.** *Rhopalaea abdominalis* (Sluiter, 1898): A) Individuo con túnica; B) Sifones y musculatura; C) Lóbulos orales y pigmentos; D) Tentáculos orales; E) Velo; F) Tubérculo dorsal; G) Individuo sin túnica; H); H) Faringe: lado izquierdo; I) Faringe: lado derecho; J) Abdomen; K) Gónadas; L) Ganglio neuronal. 39
- Lámina 3.** *Rhopalaea birkelandi* Tokioka, 1971: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica; C) Sifones; D) Lóbulos; E) Tentáculos orales; F) Tubérculo dorsal; G) Glándula neuronal; H) Estigmas; I) Lámina dorsal; J) Abdomen; K) Lóbulos anales; L) Gónadas. 43
- Lámina 4.** *Didemnum* sp.: A) Colonia adherida al sustrato; B) Espículas; C) Partículas de carbonato de calcio; D) Colonia sin sustrato; E) ; D) Zooide: Tórax; F) Zooide: Estómago. 46
- Lámina 5.** *Didemnum* aff. *recurvatum* Sluiter, 1909: A) Colonia adherida al sustrato; B) Colonia sin sustrato; C) Espículas; D) Zooide. 50
- Lámina 6.** *Didemnum vanderhorsti* Van Name, 1924: A) Colonia adherida al sustrato; B) Colonia sin sustrato; C) Espículas; D) Zooide: Tórax; E) Zooide: Estómago; F) Larva. 54
- Lámina 7.** *Trididemnum savignii*: A) Colonia; B) Espículas; C) Zooide; D) Larva. 60
- Lámina 8.** *Eudistoma* sp. 1: A) Colonia; B) Zooide 1: Embebido en la túnica; C) Zooide 2: Embebido en la túnica; D) Zooide: Forma 1; E) Zooide: Forma 2; F) Zooide: Forma 3; G) Zooide: Forma 4; H) Zooide: Forma 5. 63
- Lámina 9.** *Eudistoma* sp. 2: A) Colonia; B) Zooide; C) Tórax del zooide 1; D) Zooide 2; E) Zooide 3; F) Área abdominal. 66
- Lámina 10.** *Eudistoma* sp. 3: A) Colonia; B) Zooide: Forma 1; C) Zooide: Forma 2; D) Área abdominal. 69

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Lámina 11.** *Eudistoma* sp. 4: A) Colonia; B) Zooide: Forma 1; C) Zooide: Forma 2; D) Zooide: Forma 3; E) Zooide: Forma 4; F) Zooide: Forma 5; G) Zooide: Forma 6; H) Pedúnculo ectodermal. 72
- Lámina 12.** *Cystodytes* aff. *Iobatus* (Ritter, 1900): A) Colonia; B) Zooides embebidos en la túnica; C) Zooides envueltos en espículas; D) Espículas; E) Zooide: Lado derecho; F) Zooide: izquierdo. 77
- Lámina 13.** *Aplidium* sp.: A) Colonia; B) Zooide: Forma 1; C) Zooide: Forma 2; D) Zooide: Forma 3; E) Zooide: Forma 4; F) Zooide: Forma 5. 80
- Lámina 14.** *Ascidia ceratodes* (Huntsman, 1912): A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica; C) Lóbulos orales; D) Tentáculos orales; E) Lóbulos atriales; F) Tubérculo dorsal; G) Ganglio neuronal; H) Estigmas; I) Papilas proyectadas en los vasos longitudinales; J) Lámina dorsal; K) Gónadas; L) Ano. 85
- Lámina 15.** *Ascidia liberata* Sluiter, 1887: A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica; C) Fibras musculares; D) Estómago; E) Musculatura externa; F) Lóbulos orales; G) Tentáculos orales; H) Sifón atrial; I) Tubérculo dorsal; J) Ganglio neuronal; K) Estigmas; L) Gónadas. 89
- Lámina 16.** *Ascidia sideralis* Bonnet y Rocha, 2013: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica: derecha; C) Individuo sin túnica: izquierda; D) Puntos de pigmento en los lóbulos ; E) Lóbulos; F) Individuo disectado; G) lado derecho; H) Tentáculos orales; I) Tubérculo dorsal; J) Lámina dorsal; K) Papilas proyectadas; L) Intestino. 92
- Lámina 17.** *Ascidia* cf. *sydneyensis* Stimpson, 1855: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica; C) Musculatura externa; D) Sifón oral y atrial; E) sifón oral; F) Pigmentos en el sifón oral; G) Sifón atrial; H) Tubérculo dorsal; I) Ganglio neuronal; J) Papilas proyectadas en los vasos; K) Lámina dorsal; L) Gónadas. 96
- Lámina 18.** *Microcosmus exasperatus* Heller, 1878: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica: lado derecho; C) Individuo sin túnica: lado izquierdo; D) Lóbulos orales; E) Espinas del sifón oral; F) Tubérculo dorsal; G) Área peritubercular; H) Tentáculos orales; I) Lámina dorsal; J) Individuo disectado: pliegues; K)

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Organismo disectado: lado derecho; L) Organismo disectado: lado izquierdo.

..... 106

Lámina 19. *Pyura haustor* (Stimpson, 1864): A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica: lado; C) Sifón oral: musculatura; D) Lóbulos orales; E) Tentáculos orales; F) Tubérculo dorsal G) Pliegues torácicos; H) Pliegues; I) Estigmas; J) Divertículo gástrico; K) Endocarpos; L) Gónadas..... 110

Lámina 20. *Pyura lignosa* Michaelsen, 1908: A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica; C) Sifón oral; D) Sifón atrial; E) Tentáculos orales; F) Pliegues branquiales; G) Estigmas; H) Tubérculo dorsal; I) Lámina dorsal; J) Ano; K) Divertículo gástrico; L) Gónadas. 114

Lámina 21. *Pyura* sp.: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica: lado derecho; C) Espinas D) Individuo sin túnica: lado izquierdo; E) Lóbulos orales; F) Área peritubercular; G) Tubérculo dorsal; H) Individuo, Kdisectado: Pliegues; I) Faringe: vasos longitudinales; J) Gónadas; K) Intestino; L) Divertículo gástrico. 117

Lámina 22. *Pyura Stolonifera* (Heller, 1878): A) Individuo sin túnica: lado izquierdo; B) Individuo sin túnica: lado derecho; C) Individuo con túnica; D) Musculatura del sifón oral; E) Tentáculos orales y tubérculo dorsal; F) Lóbulos orales; G) Pliegues branquiales; H) Espículas; I) Ganglio neuronal; J) Lóbulos anales; K) Divertículo gástrico; L) Gónadas. 124

Lámina 23. *Metandrocarpa* cf. *michaelseni* Ritter y Forsyth, 1917: A) Colonia 1; B) Colonia 2; C) Individuo disectado; D) Tentáculos orales; E) Área peritubercular; F) Tubérculo dorsal; G) Estigmas; H) Estómago; I) Ano; J) Gónadas..... 127

Lámina 24. *Styela canopus* (Savigny, 1816): A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica; C) Sifones: oral y atrial; D) Lóbulos orales; E) Tentáculos orales; F) Pliegues; G) Estigmas; H) Tubérculo dorsal; I) Intestino; J) Divertículo gástrico; K) Gónadas; L) Ovocitos. 131

RESUMEN

Este trabajo constituye una importante contribución al conocimiento taxonómico de la clase Ascidiacea asociada a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano. Donde, además se obtuvieron algunos códigos de barras de ADN (COI ADNmt), para facilitar la identificación de las especies y el estudio de sus relaciones filogenéticas. Para el estudio, fueron analizados 130 individuos provenientes de 21 localidades distribuidas en seis estados. En total, fueron identificadas 27 especies pertenecientes a 13 géneros, 7 familias y 3 órdenes en los que se divide la clase Ascidiacea. De estas, 11 especies (*Rhopalaea birkelandi*, *Didemnum* aff. *recurvatum*, *D. vanderhorsti*, *Trididemnum savignii*, *Cystodytes* aff. *lobatus*, *Ascidia ceratodes*, *A. sideralis*, *A. cf. sydneyensis*, *Microcosmus exasperatus*, *Pyura haustor*, *P. lignosa* y *Styela canopus*) habían sido previamente registradas en costas del Pacífico mexicano. Mientras que 16 especies (*Diazona* aff. *carnosa*, *Rhopalaea abdominalis*, *Didemnum* sp., *Eudistoma* sp. 1, *E. sp. 2*, *E. sp. 3*, *E. sp. 4*, *Aplidium* sp., *Ascidia liberata*, *Phallusia* aff. *mammillata*, *P. aff. Nigra*, *Pyura* sp., *P. aff. squamulosa*, *P. stolonifera* y *Metandrocarpa* cf. *michaelsenii*) son nuevos registros para dicha costa. Además, se obtuvieron ocho códigos de barras de ADN que pertenecen a cuatro especies. Derivado del análisis filogenético, ninguno de los tres órdenes de Ascidiacea fue reconstruido como monofilético. El orden Stolidobranchia se consolidó como grupo parafilético al no estar constituido por todos sus representantes. Mientras que los órdenes Aplousobranchia y Phlebobranchia se encontraron compartiendo taxones, constituyéndose como grupos polifiléticos. A pesar de esto, fue posible establecer afinidades de nuestras secuencias con sus congéneres de GenBank, resultando en cuatro agrupaciones principales (a nivel de género) aunque de nuevo la monofilia de algunos de estos no pudo ser establecida. La taxonomía tradicional apoyada con marcadores moleculares (COI ADNmt) es una buena herramienta que permite dar mayor robustez a la identificación de las especies y el entendimiento de sus relaciones filogenéticas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Palabras claves: ecosistemas coralinos; ascidias; taxonomía tradicional; códigos de barras de ADN; filogenia.

ABSTRACT

This work constitutes an important contribution to knowledge of the Class Ascidiacea associated to coral ecosystems from Mexican Pacific. Here is also presented some DNA-barcodes (COI ADNmt), obtained to facilitate the species identification and the study of their phylogenetic relationships. In total, 130 individuals from 21 localities were analyzed. 27 species belonging to 13 genera, 7 families and 3 orders in which Ascidiacea is divided, were identified. From which, 11 species (*Rhopalaea birkelandi*, *Didemnum* aff. *recurvatum*, *D. vanderhorsti*, *Trididemnum savignii*, *Cystodytes* aff. *lobatus*, *Ascidia ceratodes*, *A. sideralis*, *A. cf. sydneyensis*, *Microcosmus exasperatus*, *Pyura haustor*, *P. lignosa* and *Styela canopus*) have already been recorded in the Mexican Pacific coasts. While, 16 species (*Diazona* aff. *carnosa*, *Rhopalaea abdominalis*, *Didemnum* sp., *Eudistoma* sp. 1, *E. sp. 2*, *E.sp. 3*, *E. sp. 4*, *Aplidium* sp., *Ascidia liberata*, *Phallusia* aff. *mammillata*, *P. aff. nigra*, *Pyura* sp., *P. aff. squamulosa*, *P. stolonifera* and *Metandrocarpa* cf. *michaelsenii*) are new records for the same area. Additionally, eight barcodes belonging to four species were obtained. From phylogenetic analysis, none of the three orders were recovery as monophyletic. The order Stolidobranchia was paraphyletic because it was not included all of their representatives. While the orders Aplousobranchia and Phlebobranchia were polyphyletic. Despite this scenery, it was possible to establish affinities of our sequences with their congeners from GenBank, resulting in four main groupings. The traditional taxonomy supported by molecular markers (COI mtDNA) is an efficient tool that permits give more support to taxonomic decision for species identification, and also understanding the phylogenetic relationships among species.

Keywords: coral ecosystems; ascidians traditional taxonomy; DNA barcodes; phylogeny.

I. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son estructuras acuáticas reconocidas por proporcionar servicios para la pesca, el turismo, protección del litoral y equilibrio en los procesos geológicos (Jaap, 2000). Pero sin duda su mayor importancia radica en presentar la mayor diversidad de especies por unidad de área, en comparación con hábitats terrestres (ej. selvas tropicales) (Spalding *et al.*, 2001). Esto debido en gran parte a que proporcionan una gran diversidad de hábitats y microhábitats (Enochs y Manzello, 2012), lo que permite el establecimiento de una gran variedad de especies y su intercambio entre ellos y otros sistemas (Sale, 2004).

Entre la diversidad biológica que presentan los ecosistemas coralinos los organismos filtradores como las ascidias (o “*sea squirts*”) juegan un papel muy importante para su funcionamiento (Spalding *et al.*, 2001). Hasta ahora se ha podido reconocer que ciertas especies proporcionan microambientes que alojan una gran diversidad de microorganismos como proteobacterias, bacteroidetes, plactomycetes y cianobacterias, los cuales desarrollan una relación simbiótica con la ascidia (que generalmente resulta beneficiosa para ellas) (Hamada *et al.*, 2012; Erwin *et al.*, 2014). También, las ascidias contribuyen al funcionamiento de dichos ecosistemas al ayudar a remover las partículas de placton, picoplacton, nanoplacton, micropilacton y partículas de nitrógeno mediante el proceso de filtración (Ribes *et al.*, 2005). A pesar de su importancia, el conocimiento taxonómico de la diversidad de especies de ascidias que habitan estos ecosistemas ha sido muy pobremente estudiado y hoy en día aún se desconoce mucho sobre la importancia de este grupo en los ecosistemas coralinos.

Las ascidias es el nombre común con el que se conoce a la clase Ascidiacea, la cual pertenece al subfilum Urocordata (=Tunicata). Se trata de organismos bentónicos y sésiles que pueden presentar dos modelos de organización: solitario o colonial. Su principal característica física es la presencia de 2 sifones (oral y exhalante), los cuales se encuentran siempre hacia arriba y alejados del sustrato (Brusca y Brusca, 2002).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Las ascidias se pueden encontrar en todo tipo de ambientes marinos (Monniot *et al.*, 1991), desde el trópico hasta las regiones polares, donde habitan principalmente la zona litoral (Selva *et al.*, 2012). Esto las convierte en un grupo abundante y diverso con cerca de 25 familias y 177 géneros (World Register of Marine Species, 2017).

Las ascidias tienen importancia farmacológica, ecológica e incluso se ha considerado como recurso alimenticio. En la farmacología se ha demostrado que estos organismos son productores de sustancias bioactivas con actividad citotóxica, antitumoral (Menna, 2009), antiviral (Rinehart *et al.*, 1981) y anticancerígena: mieloma múltiple, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, cáncer de mama (Faivre *et al.*, 2005). Como organismos filtradores han destacado en el área de la ecología, ya que han sido utilizados como bioindicadores o biomonitores de la calidad del agua, esto debido a su alta capacidad de concentrar elementos tóxicos (como metales pesados) e hidrocarburos (Monniot *et al.*, 1991). Además de proporcionar un índice de eutrofización (Ribes *et al.*, 2005) y por formar parte de la fauna incrustante o “*fouling*” (Lambert y Lambert, 1998). Mientras que, como recurso pueden servir como alimento para algunos peces (Brusca y Brusca, 2003), incluso para la población humana como es el caso de *Pyura chilensis* Molina, 1782 en algunos lugares de Chile (Davis, 1995).

A pesar de la gran importancia que representan, la gestión y el uso de las ascidias depende en gran medida de su correcta identificación taxonómica. Hasta ahora se han descrito alrededor de 2.815 especies a nivel mundial (Shenkar y Swalla, 2011). De esta cifra tan solo 40 especies han sido registradas en las costas del Pacífico mexicano, habitando en diferentes ambientes y adheridas a distintos tipos de sustrato (cascos de barcos, raíces de mangle, cultivo de ostras, etc.) (ej. Lambert y Lambert, 1998, 2003; Cohen *et al.*, 2005; Okolodkov *et al.*, 2007). Por su parte, el estudio taxonómico de especies de ascidias asociadas a arrecifes coralinos en el Pacífico mexicano es poco conocido.

Además, pese a los esfuerzos por desarrollar una base taxonómica de las ascidias, la identificación errónea de las especies es un problema que se da con gran frecuencia (Lambert, 2009). Bajo estas circunstancias, durante los últimos años, el uso

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

de marcadores moleculares específicamente de secuencias de ADN está resultando especialmente útil para identificar especies marinas en situaciones donde la morfología tradicional es muy difícil y/o controvertida (Darling y Blum, 2007). El código de barras de la vida (*DNA-barcoding*) es una propuesta que busca identificar especies a través de un fragmento de ADN mitocondrial específicamente del extremo 5' (cerca de 648 pares de base, Pb) del gen que sintetiza la subunidad 1 del citocromo c Oxidasa (COI) (Hebert *et al.*, 2003).

El Código de barras de ADN ha sido empleado para registrar especies de ascidias como *Polyclinum madrasensis* Sebastian, 1952 y *Ciona Savignyi* Herdman, 1882, así como especies del género *Didemnum* entre otras (Hirose *et al.*, 2012; Selva *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012). Además de su uso en el reconocimiento de especies, también se han realizado estudios de correlación de parentesco utilizando matrices de información a partir de moléculas de ADN y características morfológicas. Con esta información se han establecido árboles filogenéticos que han contribuido a esclarecer el panorama evolutivo del grupo (ej. Shenkar y Swalla, 2011; Pyo *et al.*, 2012; Hernández, 2015).

Este trabajo tiene como objetivo contribuir al conocimiento taxonómico y de la biodiversidad de ascidias asociados a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano. Esto mediante el uso combinado de características morfológicas y marcadores moleculares, para la identificación taxonómica de las especies, y el establecimiento de su posición sistemática dentro del grupo, lo cual generará hipótesis más robustas sobre los límites entre las especies, y sus relaciones filogenéticas. A la par, se presentarán los primeros códigos de barras de ADN (*DNA barcoding*) de Ascidiacea en las costas de México, lo que facilitará la identificación de las especies a personas no expertas en el grupo, impulsando así el desarrollo de distintas investigaciones (ecológicas, biotecnológicas, etc.) que involucren a este importante grupo zoológico.

II. ANTECEDENTES

2.1 Historia taxonómica de las ascidias

La primera identificación de una ascidia fue realizada por Aristóteles (384-322 a.C.), quien de acuerdo con su descripción fue incluida junto con las esponjas en el grupo de las *Tethya* (por su aparente parecido con estas esponjas). Posterior a ello, Linnaeus (1767) las clasificó en dos grupos (de acuerdo con su evidente modelo de organización): moluscos acéfalos (actualmente denominadas ascidias solitarias) y zoophytons (actualmente denominadas ascidias coloniales). Años más tarde, Savigny (1816) las reconoció como un mismo grupo, las unificó y las clasificó nuevamente en el grupo de las esponjas. Más adelante, Lamarck (1816) las consideró como un grupo distinto a las esponjas, los incluyó en los Radiata y Vermes, asignándoles por primera vez el nombre Tunicata (para referirse a las ascidias, pirosoomas y salpas). Finalmente, Kowalevsky (1874) demostró que se debían incluir dentro de los cordados al observar la notocorda de una larva, lo que permitió su ubicación sistemática actual. Debido a que su ubicación fue dentro de los cordados, Balford (1881) reemplazó el nombre de Tunicata por Urochordata.

Desde entonces y hasta la fecha se han publicado numerosos trabajos sobre la biología (De Caralt *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2013), ecología (Hernández-Zanuy *et al.*, 2006), fisiología (Hernández-Zanuy *et al.*, 2006), etc., de estos individuos, así como, estudios taxonómicos (Lambert y Lambert, 1998; Clarke y Castilla, 2000; Lambert, 2003; Bonnet y Rocha, 2000). Sin embargo, estos últimos son escasos al compararlos con otros grupos zoológicos, probablemente por las dificultades que implica su identificación.

De acuerdo con el estudio realizado por (Shenkar y Swalla, 2011), la mayoría de las especies de ascidias descritas (más de 60%) se atribuyen a siete expertos en taxonomía (Monniot y Monniot, Kott, Sluiter, Millar, Herdman, Michaelsen y otros). Los autores incluyen una lista con el número de especies registradas hasta la fecha

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

(aproximadamente 2800), en la cual, la mayoría de los registros corresponden a: Australia (con 717), Nueva Caledonia (317), Tasmania (249) y Mar Mediterráneo (229).

Específicamente en las costas mexicanas, el conocimiento biológico (taxonómico, ecológico, faunístico, etc.) de este grupo zoológico ha sido muy poco desarrollado (ej. (Salgado-Barragán *et al.*, 2004; Okolodkov *et al.*, 2007; Tovar-Hernández *et al.*, 2012). Los pocos trabajos hasta ahora realizados están enfocados principalmente al estudio de especies consideradas exóticas o invasoras, las cuales se han encontrado adheridas a cascos de barcos, raíces de mangle, cultivo de ostras, etc. (ej. Lambert y Lambert, 1998, 2003; Cohen *et al.*, 2005; Okolodkov *et al.*, 2007). Mientras que los estudios taxonómicos y la implementación de marcadores moleculares para la identificación y estudio biológico de especies de ascidias asociadas a arrecifes coralinos en México son completamente inexistente.

2.2 Revisión del conocimiento faunístico de ascidias en el Pacífico Oriental Tropical (POT)

En la costa del Pacífico mexicano es muy poco conocida la diversidad de la clase Ascidiacea, por lo que, en el presente trabajo de investigación se presenta una revisión exhaustiva sobre el conocimiento faunístico de las ascidias a lo largo del Pacífico Oriental Tropical (POT). Esta región del Pacífico se extiende desde los 24°37'N y 112°09'O, hasta los 05°48'S y 81°06'O e incluye las provincias biogeográficas de Cortez (desde el Golfo de California, hasta Topolobampo, Sinaloa), Mexicana (desde Mazatlán hasta el Golfo de Tehuantepec) y Panámica (desde el Golfo de Fonseca, hasta Punta Aguja, Perú) hasta Punta Aguja, en Perú (Salazar y Londoño, 2004).

Los primeros estudios taxonómicos sobre ascidias del Pacífico Oriental iniciaron con Van Name en 1945, quien registró 30 especies para el POT, de las cuales 11 pertenecen al Pacífico mexicano. Pese a su importante contribución el interés por las ascidias volvió a cobrar expectativas hasta 22 años después, cuando Tokioka (1967)

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

registró por primera vez a *Didemnum candidum* Savigny, 1816 en la isla Galápagos y pocos años después, en 1971 describió una especie del género *Rhopalaea* (*R. birkelandi* Tokioka, 1971) en las costas del Pacífico en Costa Rica. Posteriormente, Monniot (1994) revisó ejemplares provenientes de la costa de Centroamérica donde comparó y re-describió a *Pyura lignosa* Michaelsen, 1908, asimismo, incorporó las descripciones de otras tres especies similares (Tabla 1).

Los registros de especies aumentaron cuando Lambert y Lambert (2003) realizaron un análisis minucioso basado en la abundancia de especies de ascidias colectadas (desde 1994 al año 2000) en 29 sitios que abarcó desde las costas de Estados Unidos, hasta Ensenada, Baja California (muestreada en el año 2000) en donde por primera vez se registraron siete especies (Tabla 1). Posteriormente Sanamyan y Schories (2004) registraron cuatro especies de ascidias en Perú (Tabla 1).

Entre las primeras aportaciones sobre tunicados en las costas del Pacífico mexicano se encuentra la de Salgado-Barragán *et al.* (2004), quien documentó la presencia de la ascidia introducida *Styela canopus* (Savigny, 1816) en el Estero de Urías en Mazatlán (Sinaloa), asociada a raíces de mangle rojo (*Rhizophora mangle* Linnaeus, 1753).

Okolodkov *et al.* (2007) realizaron un análisis de especies acuáticas no indígenas (EANI) en México. En dicho estudio se confirmó la presencia (introducción) de cinco de las 14 especies de ascidias registradas por Lambert y Lambert (1998) en el sur de California, las cuales se sugiere han invadido la península de Baja California (Tabla 1).

Rodríguez e Ibarra-Obando (2008) estudiaron las comunidades causantes de *fouling* en el cultivo de ostras de la bahía de San Quintín, Baja California. En su trabajo determinaron que el 40% de las especies eran ascidias, reportando así a 13 especies, de las cuales 10 son consideradas exóticas (Tabla 1). Posteriormente Tovar-Hernández *et al.* (2010) hizo otra importante aportación para la costa de Mazatlán, Sinaloa, al

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

registrar al *Polyclinum constellatum* Savigny, 1816 (asociada al copépodo parásito *Haplostomides hawaiiensis* Ooishi, 1994) como la segunda especie de ascidia exótica en la zona y dos años después enlistó 13 especies de ascidias introducidas en el Pacífico mexicano (Tabla 1), 3 de ellas clasificadas como exóticas ocasionales (*Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767), *Lissoclinum fragile* Van Name, 1902) y *Styela clava* Herdman, 1881) y una considerada como exótica potencialmente invasora (*Styela canopus* (Savigny, 1816).

De los estudios más recientes se encuentra los realizados en la costa Pacífico de Panamá por Carman *et al.* (2011), quienes en su estudio registraron 16 especie, 3 de ellas nativas, 7 introducidas y 6 criptogénicas. Y el estudio realizado por Bonnet *et al.* (2013), en donde describieron una especie nueva (*Ascidia sideralis* sp. nov.) y documentaron la aparición de 4 especies no nativas (*A. cf. gemmata*, *A. cf. liberata*, *A. archaia* Sluiter, 1890 y *A. sydneyensis* Stimpson, 1855).

Ademas de estas contribuciones, es importante resaltar algunos trabajos como informes de proyectos (Carballo, 2006) y algunas tesis de licenciatura (Moreno-Dávila, 2010; Ramírez, 2013; Hernández, 2015) y maestría (Hernández-Inda, 2003; Moreno-Dávila, 2013) que sin duda tambien constituyen una importante aportación al conocimiento biológico de la fauna de ascidias de Mexico.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 1. Registro de ascidias del POT (trabajos publicados).

Autor	Año	Sitio de procedencia	Especies
Monniot	1994	Costa de centro América	<i>Pyura vannamei</i> , <i>Pyura cadamostoi</i> y <i>Pyura shiinoi</i> .
Lambert y Lambert	2003	Ensenada, Baja California	<i>Botrylloides violaceus</i> , <i>Botryllus schlosseri</i> , <i>Ciona intestinalis</i> , <i>Microcosmus squamiger</i> , <i>Polyandrocarpa zorritensis</i> , <i>Styela clava</i> y <i>Styela plicata</i> .
Sanamyan y Schories	2004	Reserva nacional de Paracas, Perú	<i>Botrylloides perspicuus</i> , <i>Ciona intestinalis</i> , <i>Diplosoma listerianum</i> y <i>Aplidium peruvianum</i> .
Okolodkov <i>et al.</i>	2007	Península de California	<i>Botryllus violaceus</i> , <i>Botryllus schlosseri</i> , <i>Ciona intestinalis</i> , <i>Styela canopu</i> y <i>Styela clava</i> .
Rodríguez e Ibarra-Obando	2008	Bahía de San Quintín	<i>Ascidia zara</i> , <i>Botrylloides perspicuum</i> , <i>Botrylloides violaceus</i> , <i>Botryllus schlosseri</i> , <i>Ciona</i> sp., <i>Didemnun</i> sp., <i>Microcosmus squamiger</i> , <i>Polyandrocarpa zorritensis</i> , <i>Styela plicata</i> y <i>Symplegma reptans</i> .
Tovar-Hernández <i>et al.</i>	2012	Pacífico mexicano	<i>Ascidia zara</i> , <i>Botrylloides perspicuum</i> , <i>Botrylloides violaceus</i> , <i>Botryllus schlosseri</i> , <i>Microcosmus squamiger</i> , <i>Polyandrocarpa zorritensis</i> , <i>Polyclinum constellatum</i> , <i>Styela plicata</i> , <i>Symplegma reptans</i> , <i>Ciona intestinalis</i> , <i>Lissoclinum fragile</i> , <i>Styela clava</i> y <i>Styela canopus</i> .

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

2.3 Revisión del conocimiento de estudios de ascidias asociadas a ecosistemas coralinos

El conocimiento faunístico de ascidias asociadas a arrecifes de coral ha sido muy pobremente estudiado en las costas del POT. Existen trabajos en donde se han enfocado en el conocimiento de la biodiversidad de invertebrados marinos, entre ellos se encuentra el realizado por Brusca y Thomson (1975), quienes detectaron la presencia de *Aplidium* spp., *Ascidia interrupta* Heller, 1878, *Rhopalaea* sp. y *Distaplia* sp., en la costa de Cabo Pulmo en el Golfo de California. También, se han realizado estudios en donde se han descrito y registrado especies de ascidias asociadas a arrecifes coralinos en la costa del mar Caribe en Bocas del Toro, Panamá (Rocha *et al.*, 2005; Bonnet y Rocha, 2011).

Por otra parte, se ha podido determinar la función que desempeñan algunas ascidias que habitan en los corales, esto derivado de su previa identificación taxonómica. Shenkar y Monniot (2006) identificaron la presencia de *Botryllus eilatensis* en la costa del mar rojo de Israel, en su análisis observaron que esta especie puede competir por el espacio con los corales, como resultado del aumento de nutrientes en el agua. Aunque también pueden ayudar a remover partículas de plancton y de nitrógeno orgánico (Ribes *et al.*, 2005).

En general, se puede decir que solo existe un estudio descriptivo basado exclusivamente en taxonomía de ascidias en el Pacífico occidental, en Nueva Caledonia (Monniot *et al.*, 1991).

2.4 Marcadores moleculares y taxonomía de ascidias

Entre los trabajos más sobresalientes basados en secuencias de ADN para los Urochordata se encuentra el de Delsuc *et al.*, (2008) quienes mediante un análisis filogenético derivado de 146 genes del rRNA estableció que éste Subphylum aparece como el grupo más cercano a los vertebrados. Otro trabajo de interés es el realizado por Moreno y Rocha (2008), quienes analizaron el orden Aplousobranchia basado en características morfológicas y moleculares de ascidias recolectadas en las costas de Brasil. También se han realizado estudios a nivel de género como el de Pérez-Portela, *et*

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

al. (2007) quienes estudiaron (molecular y morfológicamente) 120 colonias diferentes de ascidias del género *Pycnoclavella* colectadas en el Mar Mediterráneo occidental y Atlántico nororiental, para establecer una relación filogenética a través del gen mitocondrial COI, mediante el cual se determinó que existen seis especies diferentes en dichos sitios.

Boyd *et al.* (1990) determinaron la congruencia entre los estudios morfológicos y moleculares realizados a especies del género *Botryllus* colectados en Monterey (California) y Woods Hole (Massachusetts), lo que les permitió determinar que pertenecían a la especie *B. schlosseri*. Por otra parte, Lee y Shin (2014) compararon a las ascidias *Ciona intestinalis* y *Ciona savignyi* colectadas en 27 puertos de Corea, en donde se encontraron diferencias moleculares y morfológicas entre ambas especies, determinando así a *C. intestinalis* como especie exótica introducida y a *C. savignyi* como primer registro en Corea.

Otras aportaciones han sido el uso combinado de marcadores mitocondriales (COI ADNmt) y ribosomales (18S ADNr) para determinar la existencia de invasiones de especies del género *Didemnum* (identificadas como *Didemnum sp.* A y B o como dos especies potencialmente nuevas), de las cuales era notable su existencia en distintas regiones costeras del noroeste del Atlántico noroeste (Stefaniak *et al.*, 2009). En este trabajo fueron incluidas colonias de Europa, de ambas costas de América del norte, de Japón y de Nueva Zelanda. El resultado sugirió la presencia de una sola especie, que tomando en cuenta sus características morfológicas y genéticas fue descrita como *Didemnum vexillum* Kott, 2002.

III. JUSTIFICACIÓN

Los tunicados constituyen un grupo biológico de interés por sus aplicaciones en la farmacología, ecología y como recurso alimenticio, además de su reconocida capacidad de invasión. Pese a su importancia, el conocimiento sobre la biodiversidad de los tunicados en México ha sido poco desarrollado. Esto debido principalmente a la dificultad taxonómica que representa su identificación. Los pocos trabajos que se han realizado hasta ahora están enfocados a registros de especies comunes y de amplia distribución, y mayormente involucrados en el estudio de especies exóticas o potencialmente invasoras que se han encontrado adheridas a los cascos de barcos, raíces de mangle, cultivo de ostras, entre otros. Bajo estas circunstancias, es evidente la necesidad de realizar esfuerzos para desarrollar un buen conocimiento sobre la biodiversidad de ascidias en un ambiente tan importante como lo son los ecosistemas coralinos, esto con la finalidad de sentar una base firme para el conocimiento de su fauna.

Además, la dificultad taxonómica basada en la morfología pone de manifiesto la importancia de incorporar otro tipo de datos, como el análisis de marcadores moleculares con la finalidad de generar hipótesis taxonómicas y filogenéticas robustas. Los marcadores moleculares (ej. Códigos de barras de ADN) sin duda facilitarán e impulsarán el desarrollo de investigaciones que involucren a los tunicados. Esto debido a que se contará con una potente herramienta de identificación basada en secuencias de ADN (taxonomía molecular), la cual estará disponible para personas que no sean expertas en el grupo, potencializando así las investigaciones en otros campos, por ejemplo, el ecológico y el farmacológico.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la biodiversidad de ascidias asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano mediante el análisis combinado de características morfológicas y marcadores moleculares (taxonomía integrativa), para la identificación de especies y el entendimiento de sus relaciones filogenéticas.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar y describir morfológicamente las especies de ascidias recolectadas en el presente estudio, así como las incluidas en la colección de “Ascidias del Pacífico mexicano” del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán.
- Generar códigos de barras de ADN (COI ADNmt) de las especies que sea posible, con la finalidad de establecer su posición sistemática y facilitar su estudio taxonómico (taxonomía molecular).
- Evaluar la congruencia entre caracteres morfológicos y moleculares en la identificación de las especies.
- Contribuir a la consolidación de una colección científica de “ascidias” en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán.

V. ÁREA DE ESTUDIO

El área geográfica considerada para este estudio corresponde a las zonas caracterizadas por presentar ecosistemas coralinos en las costas del Pacífico mexicano, la cual se extiende entre los 32°27'N, 117°07'0" y 14°32'N, 117°13'0" (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 1991; Botello *et al.*, 2000). La zona costera, se caracteriza por poseer una gran diversidad de ambientes marinos como: playas arenosas, rocosas, ecosistemas de manglar, sistemas lagunares estuarios y arrecifes de coral (Hendrickx, 1995). De este último, se estima que su fauna está constituida por 23 especies de fauna coralina, lo cual ubica a esta región dentro de las zonas con mayor riqueza específica dentro del Pacífico tropical (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998).

Las comunidades coralinas del Pacífico mexicano se encuentran distribuidas de la siguiente manera (Ilustración 1 y Tabla 2):

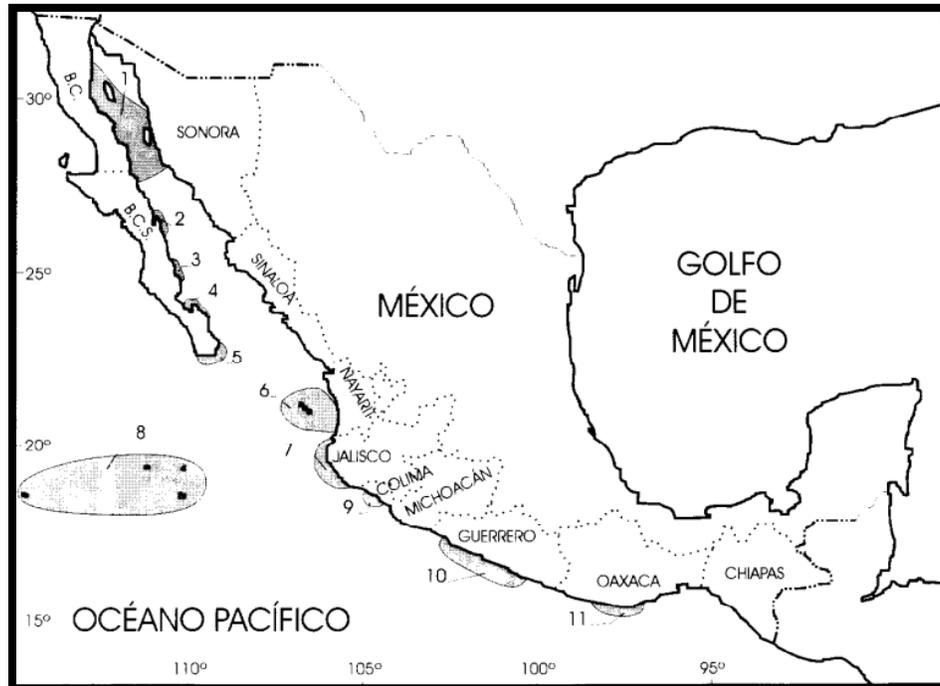


Ilustración 1. Mapa del Pacífico mexicano señalando la distribución de las comunidades coralinas (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 2. Distribución de las comunidades coralinas en el Pacífico Mexicano (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998).

Zona	Estados	Distribución
Norte	Baja California Norte	De Norte a centro del Golfo de California y Sur
	Baja California Sur	De Bahía Concepción a Isla Coronados
	Baja California Sur	En Isla del Carmen, Loreto y Bahía Agua Verde
	Baja California Sur	En Isla San José, La Paz e Isla Cerralvo
	Baja California Sur	De Cabo Pulmo a Cabo San Lucas
Centro	Nayarit	De Isla Jaltemba a Punta Mita, De Isla Isabel a Islas Marías
	Nayarit	De Bahía de Banderas a Bahía Tenacatita
	Colima	Isla Revillagigedo
	Colima	Manzanillo
Sur	Guerrero	Zihuatanejo a Acapulco
	Oaxaca	Puerto escondido a Huatulco

Sin embargo, a pesar de conocer la distribución de los corales, no se ha establecido de manera concreta si estos forman verdaderos arrecifes coralinos o no, ante tal situación y para fines prácticos en este trabajo de investigación se colectaron individuos en sitios que presentan dichas estructuras, sin importar si forman o no sistemas arrecifales.

5.1 Selección de las localidades de colecta

Para la selección de los sitios de colecta se tomaron en cuenta las áreas de distribución de ecosistemas coralinos a lo largo de la costa del Pacífico mexicano (mencionadas anteriormente. Ilustración 1 y Tabla 2). Dichas áreas fueron divididas en tres grandes zonas geográficas de la siguiente manera: norte, centro y sur (Tabla 2). Posteriormente se seleccionaron algunas localidades, de tal manera que se tuvieran individuos representantes de cada zona (norte, centro y sur). Cabe mencionar, que no todos los ejemplares analizados fueron colectados en este estudio, algunos de ellos

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

fueron previamente colectados y preservados, cuya proveniencia es de la colección de ascidias pertenecientes al Laboratorio de Ecología del Bentos, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán.

En general, se analizaron individuos provenientes de los siguientes 21 sitios de colecta (Ilustración 2), de los cuales se tomó la información de su localización geográfica (Tabla 3.).

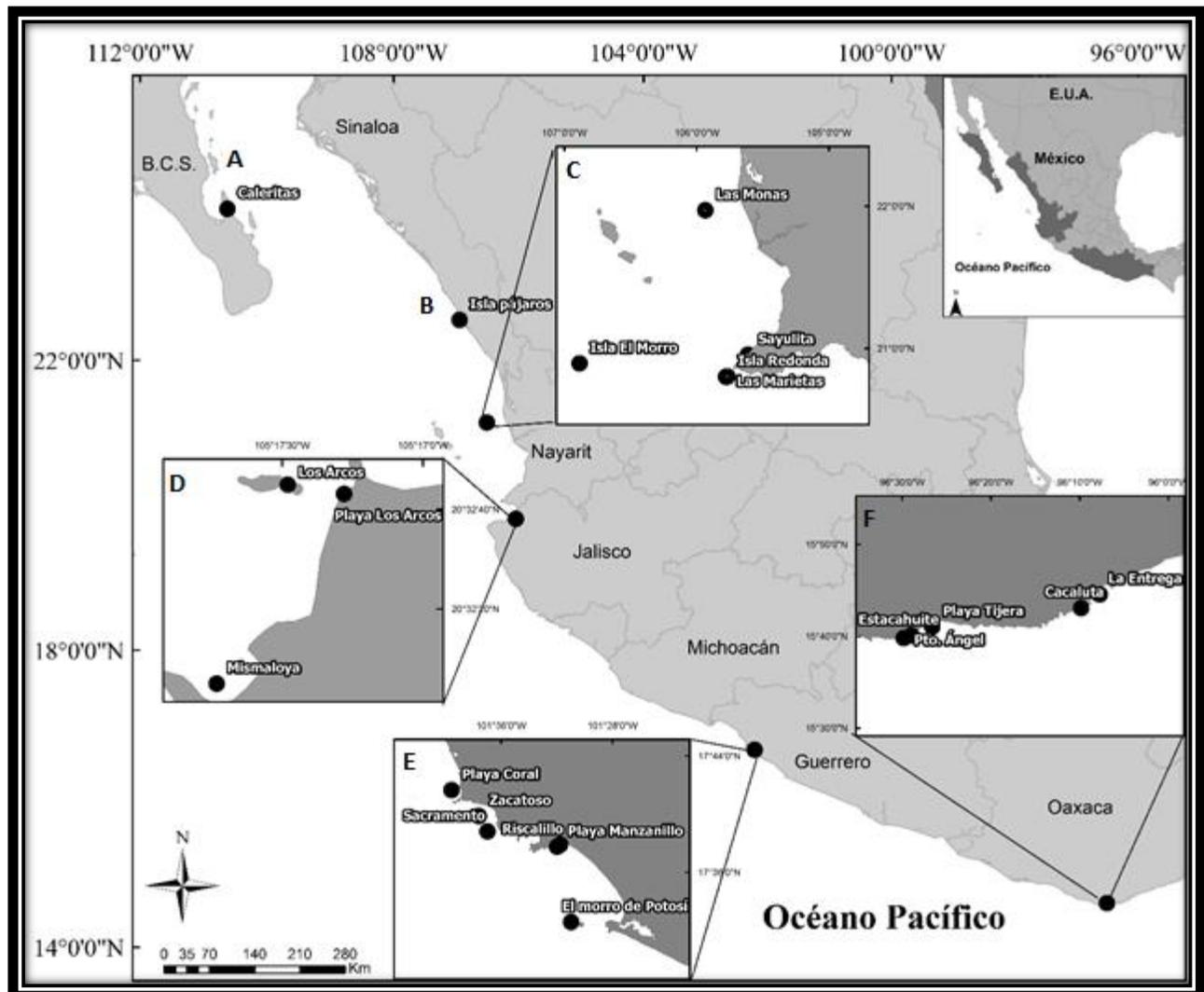


Ilustración 2. Localidades de colecta: A) Baja California Sur, B) Sinaloa; C) Nayarit, D) Jalisco, E) Guerrero y F) Oaxaca.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 3. Sitios de colecta y su ubicación geográfica.

Sitios de muestreo			Ubicación geográfica	
Estado	Núm.	Nombre	Latitud Norte	Longitud Oeste
Baja California Sur	1	Caleritas [°]	24°21'15"	110°16'58"
Sinaloa	2	Isla Pájaros [°]	23°15'00"	106°28'33"
Nayarit	3	Sayulita ^{°*}	20°52'10"	105°26'27"
	4	Las Monas [*]	21°50'59"	105°52'46"
	5	Las Marietas ^{°*}	20°41'56"	105°35'06"
	6	Isla El Morro [*]	21°40'22"	106°40'55"
	7	Isla Redonda [*]	20°42'04"	105°34'31"
Jalisco	8	Mismaloya ^{°*}	20°31'59"	105°16'58"
	9	Los Arcos ^{°*}	20°32'41"	105°17'28"
	10	Playa Los Arcos ^{°*}	20°32'37"	105°17'16"
Guerrero	11	Sacramento [°]	17°37'55"	101°36'36"
	12	El morro de Potosí [°]	17°32'03"	101°30'05"
	13	Zacatoso [°]	17°39'13"	101°37'19"
	14	Playa Coral [°]	17°40'28"	101°39'22"
	15	Riscalillo [°]	17°37'17"	101°31'18"
	16	Playa Manzanillo [°]	17°37'10"	101°31'26"
Oaxaca	17	Cacaluta [°]	15°43'11"	96°09'48"
	18	La Entrega [°]	15°44'40"	96°07'43"
	19	Puerto Ángel [°]	15°39'49"	96°29'44"
	20	Estacahuite [°]	15°40'08"	96°28'53"
	21	Playa Tijera [°]	15°41'05"	96°26'32"

Nota: ^{*}Localidades muestreadas por el Laboratorio de Ecología del Bentos.
[°]Localidades muestreadas por el Laboratorio de Sistemática y Ecología Molecular.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

5.2 Características biológicas del área de estudio

De acuerdo con el listado faunístico de especies de corales que habitan en la costa del Pacífico mexicano, las especies encontradas en los estados donde se realizó la colecta son:

Baja California Sur: *Pocillopora sverdrupi* Durham, 1947 y *Pocillopora baueri* Squires, 1959.

Sinaloa: *Porites panamensis* Verrill, 1866 y *Pocillopora verrucosa* (Ellis y Solander, 1786)

Nayarit: *Pocillopora capitata* Verrill, 1864, *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758), *Pocillopora meandrina* Dana, 1846, *Pocillopora verrucosa* (Ellis y Solander, 1786), *Pocillopora baueri* Squires, 1959, *Pocillopora lobata* Dana, 1846, *Pocillopora panamensis* Verrill, 1866, *Pocillopora stellata* (Verrill, 1868), *Pocillopora superjicialis* Gardiner, 1898, *Pavona clavus* (Dana, 1846), *Pavona gigantea* Verrill, 1869, *Fungia curvata* Hoeksema, 1989 y *Fungia distorta* Michelin, 1842.

Guerrero: *Pocillopora capitata* Verrill, 1864, *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758), *Pocillopora panamensis* Verrill, 1866, *Pavona gigantea* Verrill, 1869.

Oaxaca: *Pocillopora capitata* Verrill, *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758), *Pocillopora eydouxi* Milne Edwards y Haime, 1860, *Pocillopora meandrina* Dana, 1846, *Pocillopora verrucosa* (Ellis y Solander, 1786), *Pocillopora panamensis* Verrill, 1866, *Pavona gigantea* Verrill, 1869, *Pavona varians* Verrill, 1864 y *Gardineroseris planulata* Dana, 1846

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Procedencia del material examinado

Como se mencionó con anterioridad (en la sección V. Área de estudio), los ejemplares analizados en este proyecto tienen 2 diferentes procedencias: algunos fueron previamente colectados por el Laboratorio de Ecología del Bentos (LEB) para fines meramente taxonómicos. Mientras que, otros fueron colectados por el laboratorio de Sistemática y Ecología Molecular (LSEM) (para el presente estudio), los cuales fueron empleados para la integración de análisis taxonómicos y moleculares. Por lo tanto, la metodología empleada en ambos laboratorios fue la misma en el análisis taxonómico, pero difirió en el aspecto molecular.

Todos los ejemplares han sido incorporados en dos colecciones: La colección de “Ascidias del Pacífico Mexicano” registrada ante la CONABIO proyecto No. BC005 y la colección de “Tejidos y ADN genómico”, ambas ubicadas en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.2 Obtención de las muestras

Los ejemplares fueron recolectados mediante buceo libre y/o autónomo a poca profundidad (<10 m.). Los individuos se desprendieron del sustrato mediante la aplicación de fuerza mecánica con apoyo de una espátula o cuchillo. Una vez extraídas las muestras, se colocaron en bolsas de plástico (transparente) con agua de mar para su traslado hacia el laboratorio y su posterior procesamiento taxonómico y molecular.

En cada localidad se anotaron las características del hábitat, las coordenadas geográficas, profundidad y fecha de colecta, con la finalidad de relacionarlos con las especies descritas.

6.3 Base de datos y catálogo fotográfico

A partir de la información recabada en los muestreos, se creó una base de datos digital en la cual fue incorporada toda la información respecto a los ejemplares y los datos

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

se almacenaron sistemáticamente para su posterior uso. Adicionalmente, se realizó un catálogo fotográfico de los ejemplares recolectados, con la finalidad de conservar de manera visual las características externas de los individuos (color, forma, incrustaciones, etc.).

6.4 Preparación de las muestras

Se anestesió a los especímenes mediante frío, colocándose hielo y cristales de mentol directamente al agua de mar que contenía las muestras. Se dejaron reposar por varias horas hasta lograr la relajación de los organismos (apertura de los sifones). Posteriormente, se separaron las muestras para sus respectivos análisis de la siguiente manera:

- Análisis molecular: En ambos modelos de organización se retiró la túnica y sólo se conservó el tejido en frascos inmersos en alcohol al 96%. En el caso de las ascidias solitarias se depositó el saco branquial, mientras que de los especímenes coloniales se guardaron los zooides.
- Análisis morfológicos: Todos los ejemplares fueron incorporados en una solución de formol al 4% durante al menos 1 mes. Transcurrido el tiempo, se retiró el formol de las muestras y se lavaron con abundante agua para eliminar residuos. Finalmente se depositaron en frascos con etanol al 70%, con sus respectivas etiquetas.

6.5 Análisis morfológicos

El tratamiento de las muestras fue similar entre los organismos solitarios y coloniales. En individuos solitarios se retiró la túnica y se abrió el cuerpo siguiendo la línea media ventral para observar las características internas. Mientras que, en individuos coloniales se removió la túnica con la finalidad de extraer los zooides, los cuales fueron observados en el microscopio para determinar la regionalización interna del cuerpo y además para detectar la presencia y/o ausencia de espículas mediante la adición de hipoclorito de sodio directamente a la túnica. La observación de las características internas son elementos distintivos entre las especies (Ilustración 3).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

En algunos casos se realizaron laminillas para la observación espicular mediante el uso de microscopio electrónico de barrido, para llevarlo a cabo se procedió de la siguiente manera: se tomó un trozo de la túnica (especialmente del género *Didemnum*) y se quemó directamente en la flama de un mechero, posteriormente fueron depositadas en un vial inmersas en cloro, se dejaron reposar durante 24 horas, transcurrido el tiempo se retiró el cloro y se añadió alcohol al 70% (se realizaron 2 recambios). Finalmente se extrajeron las espículas del vial y se colocaron en láminas para su observación.

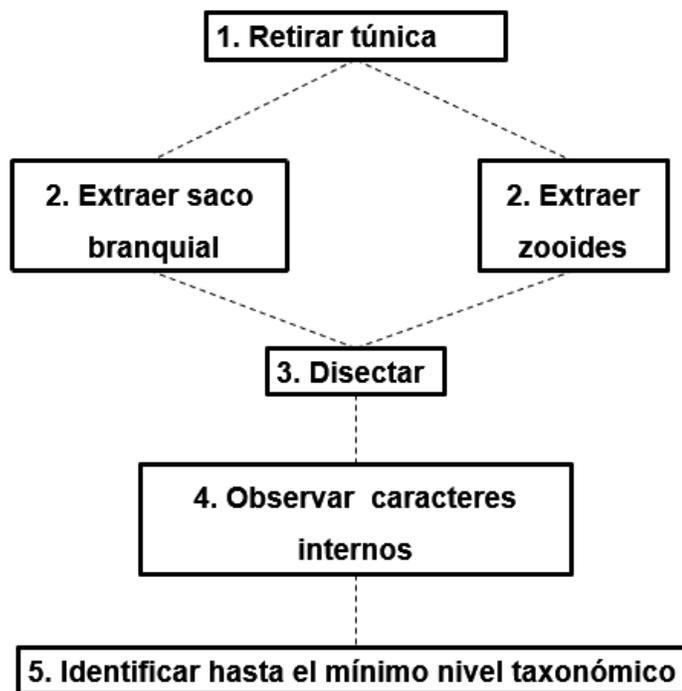


Ilustración 3. Análisis simplificado de los análisis morfológicos.

6.5.1 Descripción de las especies

Para la identificación de las especies se consultó la literatura correspondiente al Pacífico Oriental Tropical (véase antecedentes).

El formato empleado para la descripción de las especies fue el siguiente:

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Nombre taxonómico: Se asentó el nombre completo del ejemplar analizado (según sea el caso), pudiendo ser descrito hasta el mínimo nivel taxonómico (nombre de la especie original) o hasta un nivel superior (género o familia), seguido del autor y año de la descripción.
- Lámina: Se presentó una lámina por cada individuo descrito, en donde se resaltan las características de cada especie.
- Sinonimia: En el caso de poseerlas, se colocaron las sinónimas correspondientes, seguidas del autor y año.
- Material examinado: Se mencionó el número de registro con el código asignado por cada laboratorio. Para los ejemplares provenientes del laboratorio de Sistemática y Ecología Molecular (SEM), le corresponde el código SEM-TUN-número del ejemplar (1,2,3...etc.). Mientras que, para los organismos recolectados por el laboratorio de Ecología del Bentos, sólo les corresponde el código LEB, seguido de la serie de números natural (1,2,3...etc.). Posterior al código, se describió la localidad (Estado-municipio-localidad), las coordenadas geográficas, la fecha de colecta y la profundidad.
- Descripción morfológica: Se desarrolló detalladamente la descripción de los ejemplares analizados e identificados, con sus respectivas láminas, como un auxiliar al entendimiento de las características observadas.
- Comentarios morfológicos: Se presentaron algunos comentarios relacionados con cada una de las especies.
- Distribución geográfica: Se referenciaron algunas de las localidades, en las cuales se distribuyen las especies identificadas.
- Mapa de distribución geográfica: Se marcaron solamente los sitios en los cuales se encontraron las especies producto de este estudio, a lo largo del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Código de barras de ADN: De las especies que se logró obtener la secuencia nucleotídica, se hizo una breve reseña del número de pares de bases de la secuencia y el porcentaje de similitud con otras especies.
- Tabla: En los ejemplares que no pudieron ser identificados a nivel especie y que presentaban una gran variedad morfológica se realizó una tabla comparativa con cada una de las variables observadas.

6.6 Análisis con marcadores moleculares

Los análisis moleculares consistieron en una serie de pasos que consistieron en: la extracción, amplificación y secuenciación de los fragmentos de ADN, así como los análisis realizados a las secuencias obtenidas (Ilustración 4).

6.6.1 Extracción, amplificación y secuenciación de los fragmentos de ADN

Para la extracción de ADN genómico se empleó el protocolo de Aljanabi y Martínez (1997) (Anexo 1). Mientras que la amplificación de secuencias de ADN se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual se optimizaron los protocolos (tanto de concentración de reactivos como de perfiles de termociclado) para obtener resultados exitosos (véase resultados moleculares). En dichas reacciones se amplificó el extremo 5' del gen que codifica 650 pb de la subunidad 1 de la enzima Citocromo c Oxidasa del ADN mitocondrial (COI ADNmt);

Los fragmentos de ADN amplificados fueron purificados siguiendo el protocolo de Travis Glenn (Anexo 2). Una vez limpio el producto de PCR se envió a secuenciar a la empresa Macrogen, Inc, en Seúl Corea (Anexo 3).

6.6.2 Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias se realizó una serie de procedimientos, los cuales se describen a continuación:

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

6.6.2.1 Verificación y edición de las secuencias

Las secuencias se sometieron a una búsqueda con la herramienta bioinformática BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) de GenBank, con la finalidad de corroborar su origen y determinar su correspondencia con los Ascidiacea. Posteriormente se ensamblaron y editaron en el programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation), con la finalidad de corregir inconsistencias y posibles errores durante la secuenciación.

6.6.2.2 Alineamiento y análisis filogenéticos

Las secuencias fueron alineadas en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). El análisis sobre las relaciones filogenéticas se realizó empleando el método de máxima verosimilitud y el modelo general de tiempo reversible (GTR) (Ilustración 40).

6.6.2.3. Análisis de sistemática molecular

Una vez obtenido el árbol filogenético se procedió a la identificación de las afinidades y agrupaciones obtenidas para las secuencias derivadas en este estudio al comparar con secuencias de taxones cercanos. Posteriormente, a través del programa MEGA 6 se realizó un análisis de distancias genéticas a diferentes niveles taxonómicos, de la siguiente manera:

- Especie: Se determinó el valor mínimo y máximo de distancia genética existente entre la secuencia obtenida en el presente estudio y su relación con secuencias de taxones a fines.
- Género: Se obtuvo el promedio de distancia genética entre las secuencias del mismo género.
- Entre géneros: Se determinó el valor de distancias genéticas y el promedio sólo de los géneros de interés, es decir, de los géneros a los cuales pertenecen las secuencias obtenidas en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

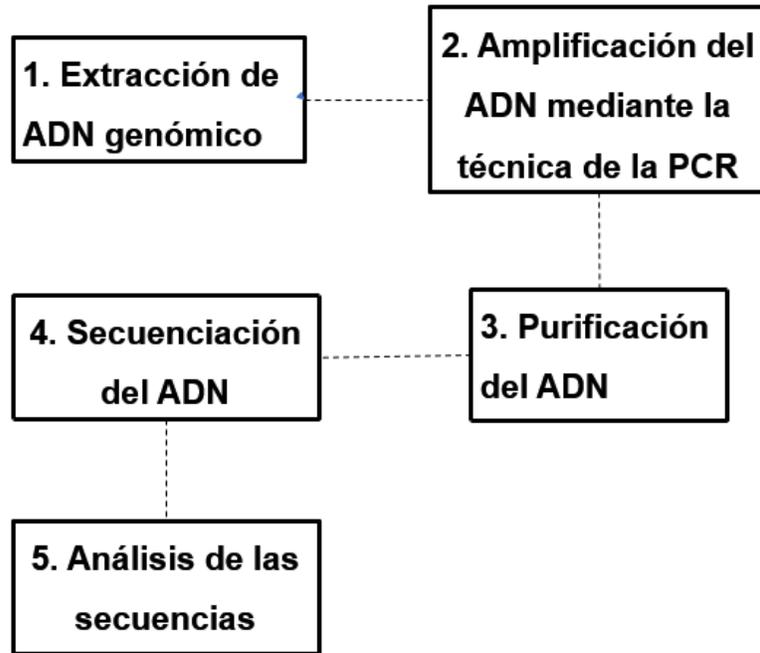


Ilustración 4. Esquema simplificado de los análisis moleculares.

VII. RESULTADOS

Se consolidó una colección de ascidias perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, a la cual se incorporaron 390 ejemplares, de los cuales 130 pertenecen a 21 sitios de ecosistemas coralinos y el resto asociados a diferentes sustratos, todos ellos ubicados a lo largo de las costas del Pacífico mexicano.

Todos los ejemplares incorporados en la colección de referencia fueron identificados hasta el mínimo nivel taxonómico posible.

7.1 Resultados morfológicos

Se revisaron 130 ejemplares, de los cuales se logró identificar 27 especies pertenecientes a 13 géneros representativos de 7 familias de los 3 órdenes en los cuales se divide la clase Ascidiacea (Ilustración 5).

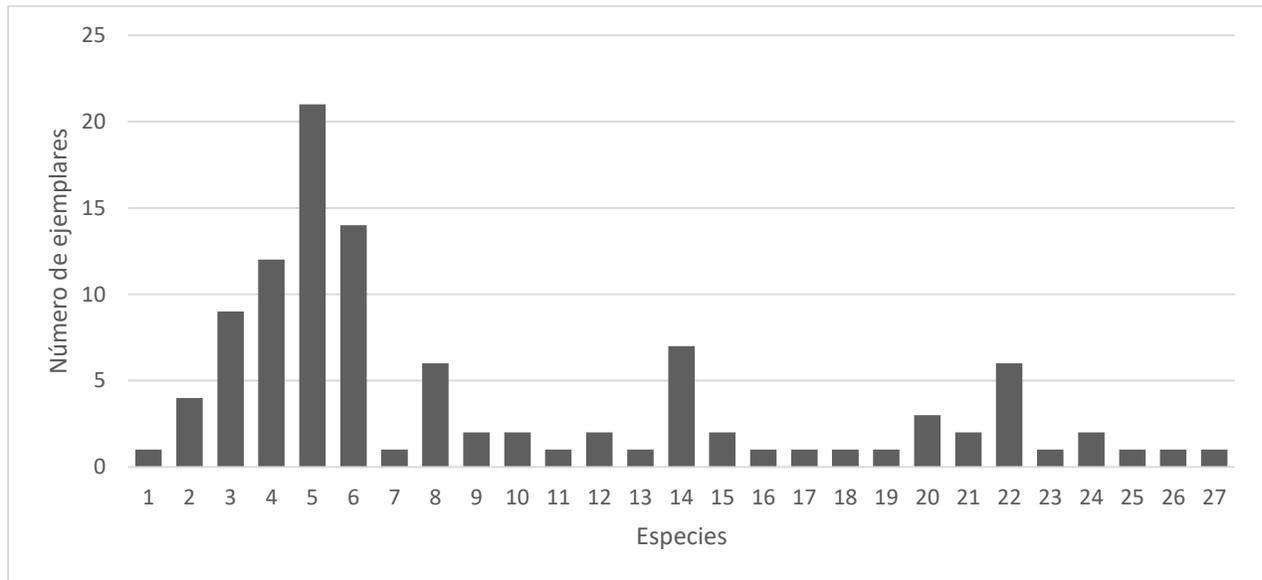


Ilustración 5. Especies: 1. *Diazona* aff. *carnea*, 2. *Rhopalaea abdominalis*, 3. *Rhopalaea birkelandi*, 4. *Didemnum* sp., 5. *Didemnum* aff. *recurvatum*, 6. *Didemnum vanderhorsti*, 7. *Trididemnum savignii*, 8. *Eudistoma* sp.1, 9. *Eudistoma* sp. 2, 10. *Eudistoma* sp. 3, 11. *Eudistoma* sp. 4, 12. *Cystodytes* aff. *lobatus*, 13. *Aplididum* sp., 14. *Ascidia ceratodes*, 15. *Ascidia sideralis*, 16. *Ascidia* cf. *sydneyensis*, 17. *Ascidia liberata*, 18. *Phallusia* af. *mammillata*, 19. *Phallusia* aff. *nigra*, 20. *Microcosmus exasperatus*, 21. *Pyura haustor*, 22. *Pyura lignosa*, 23. *Pyura* sp., 24. *Pyura* aff. *squamulosa*, 25. *Pyura stolonifera*, 26. *Metandrocarpa* cf. *michaelseni*, 27. *Styela canopus*.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

A continuación, se presenta un listado taxonómico y una descripción detallada de cada una de las especies identificadas.

7.1.1 Listado faunístico de las especies de ascidias asociadas a arrecifes de coral del Pacífico mexicano

Phylum Chordata Bateson, 1885

Subphylum Tunicata Lamarck, 1816

Clase Ascidiacea Nielsen, 1995

Orden Aplousobranchia Lahille, 1886

Familia Diazonidae Seeliger, 1906

Género *Diazona* Savigny, 1816

Diazona aff. *carnosa* Monniot y Monniot, 1996

Género *Rhopalaea* Philippi, 1843

Rhopalaea abdominalis (Sluiter, 1898)

Rhopalaea birkelandi Tokioka, 1971

Familia Didemnidae Giard, 1872

Género *Didemnum* Savigny, 1816

Didemnum sp.

Didemnum aff. *recurvatum* Sluiter, 1909

Didemnum vanderhorsti Van Name, 1924

Género *Trididemnum* Della Valle, 1881

Trididemnum savignii (Heller, 1886)

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Familia Polycitoridae Michaelsen, 1904

Género *Eudistoma* Caullery, 1909

Eudistoma sp.1

Eudistoma sp. 2

Eudistoma sp. 3

Eudistoma sp. 4

Género *Cystodytes* Von Drasche, 1884

Cystodytes aff. *lobatus* (Ritter, 1900)

Familia *Polyclinidae* Milne Edwards, 1841

Género *Aplidium* Savigny, 1816

Aplidium sp.

Orden Phlebobranchia Lahille, 1886

Familia Ascidiidae Herdman, 1882

Género *Ascidia* Linnaeus, 1767

Ascidia ceratodes (Huntsman, 1912)

Ascidia liberata Sluiter, 1887

Ascidia sideralis Bonnet y Rocha, 2013

Ascidia cf. *sydneiensis* Stimpson, 1855

Género *Phallusia* Savigny, 1816

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Phallusia aff. *mammillata* (Cuvier, 1815)

Phallusia aff. *nigra* Savigny, 1816

Orden Stolidobranchia Lahille, 1887

Familia Pyuridae Hartmeyer, 1908

Género *Microcosmus* Heller, 1877

Microcosmus exasperatus Heller, 1878

Género *Pyura* Molina, 1782

Pyura haustor (Stimpson, 1864)

Pyura lignosa Michaelsen, 1908

Pyura sp.

Pyura aff. *squamulosa* (Alder, 1863)

Pyura stolonifera (Heller, 1878)

Familia Styelidae Sluiter, 1895

Género *Metandrocarpa* Michaelsen, 1904

Metandrocarpa cf. *michaelseni* Ritter y Forsyth,
1917

Género *Styela* Fleming, 1822

Styela canopus (Savigny, 1816)

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

7.1.2 Descripción morfológica de las especies

Orden Aplousobranchia Lahille, 1886

Familia Diazonidae Seeliger, 1906

Género *Diazona* Savigny, 1816

***Diazona* aff. *carnosa* Monniot y Monniot, 1996**

Lámina 1.

Material examinado: LEB-123; Nayarit-Bahía de Banderas-Isla redonda; Lat. 20°43'55.2", Long. 105°24'43.2; 05/04/2002; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial, cuya túnica es suave, delicada y con un color rosado-traslucido (en preservación), lo cual permite ver a través de ella. En la superficie presenta incrustaciones de tubos de poliquetos y algunas algas.

En el manto del zooide, la musculatura torácica no es muy notoria. Sin embargo, se puede apreciar que está conformada por ligeras bandas longitudinales en el centro del cuerpo y algunas bandas se curvan en contra del endostilo (Lámina 1. A).

Los zooides se encuentran completamente embebidos en la túnica, estos miden 2.0 cm de largo y 0.7 cm de ancho (Lámina 1. B) con túnica, mientras que sin túnica el cuerpo mide 1.0 cm de largo y 0.4 cm de ancho (Lámina 1. C). Poseen una coloración rosada pálida en todo el manto, aumentando su tono en la base de los sifones. La forma del cuerpo es irregular: el post abdomen es más largo y ancho que el tórax y el abdomen es más largo que ambos (tórax y post abdomen). Los sifones (ambos) sobresalen de la túnica (Lámina 1.D). El sifón oral posee aproximadamente 20 tentáculos orales con un promedio de 0.08 mm de longitud (Lámina 1. E). El saco branquial presenta aproximadamente 35 vasos longitudinales de cada lado (Lámina 1. F y G). El estómago se encuentra envuelto en una capa gelatinosa (Lámina 1. H). Las gónadas se encuentran en el asa intestinal (Lámina 1. I).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Distribución geográfica: En costas filipinas: Isla de Mactan y en el Pacífico mexicano: en Isla Redonda, Bahía de Banderas, Nayarit, en el presente estudio.

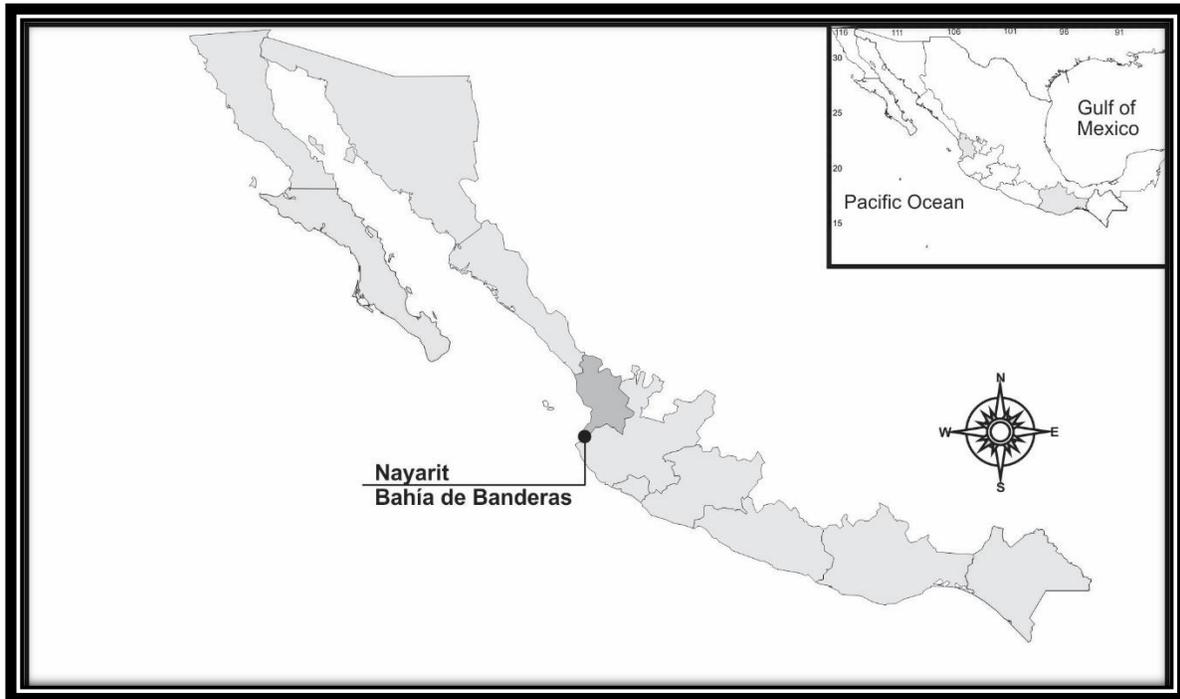


Ilustración 6. Distribución geográfica de *Diazona* aff. *carnosus* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: Actualmente solo son reconocidas 12 especies de *Diazona* en el mundo (Horton *et al.*, 2017). La mayoría de las especies han sido registradas para aguas del Indo-Pacífico, mientras que solo un registro corresponde al Mediterráneo y otro en el Atlántico de América del sur (Monniot y Monniot, 1996).

Nuestros ejemplares corresponden muy bien con a las características del género, tomando en cuenta las características observadas en nuestro individuo, este se asemeja más con *D. carnosus*, debido principalmente a su coloración rosada (única entre las especies de *Diazona*), la forma, el tamaño, la musculatura y los sifones del zooide, los cuales coinciden con la descripción realizada por Monniot y Monniot (1996) para las costas de Filipinas. Sin embargo, debido a ciertas diferencias encontradas como el número de tentáculos y el tamaño de los zooides, aunado a la gran distancia geográfica

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

respecto a la localidad tipo es posible que se trate de una especie distinta, potencialmente nueva para la ciencia.

Debido a la falta imposibilidad de una revisión mas exhaustiva por falta de material en buenas condiciones hemos preferido manetener al ejemplar con el estatus de “afin” hasta que nuevo material pueda ser revisado y corroborar si las diferencias son suficientes para describir una especie distinta. Cualquiera que sea el caso, este ejemplar constituye el primer registro de *Diazona* para las costas del Pacifico Oriental.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

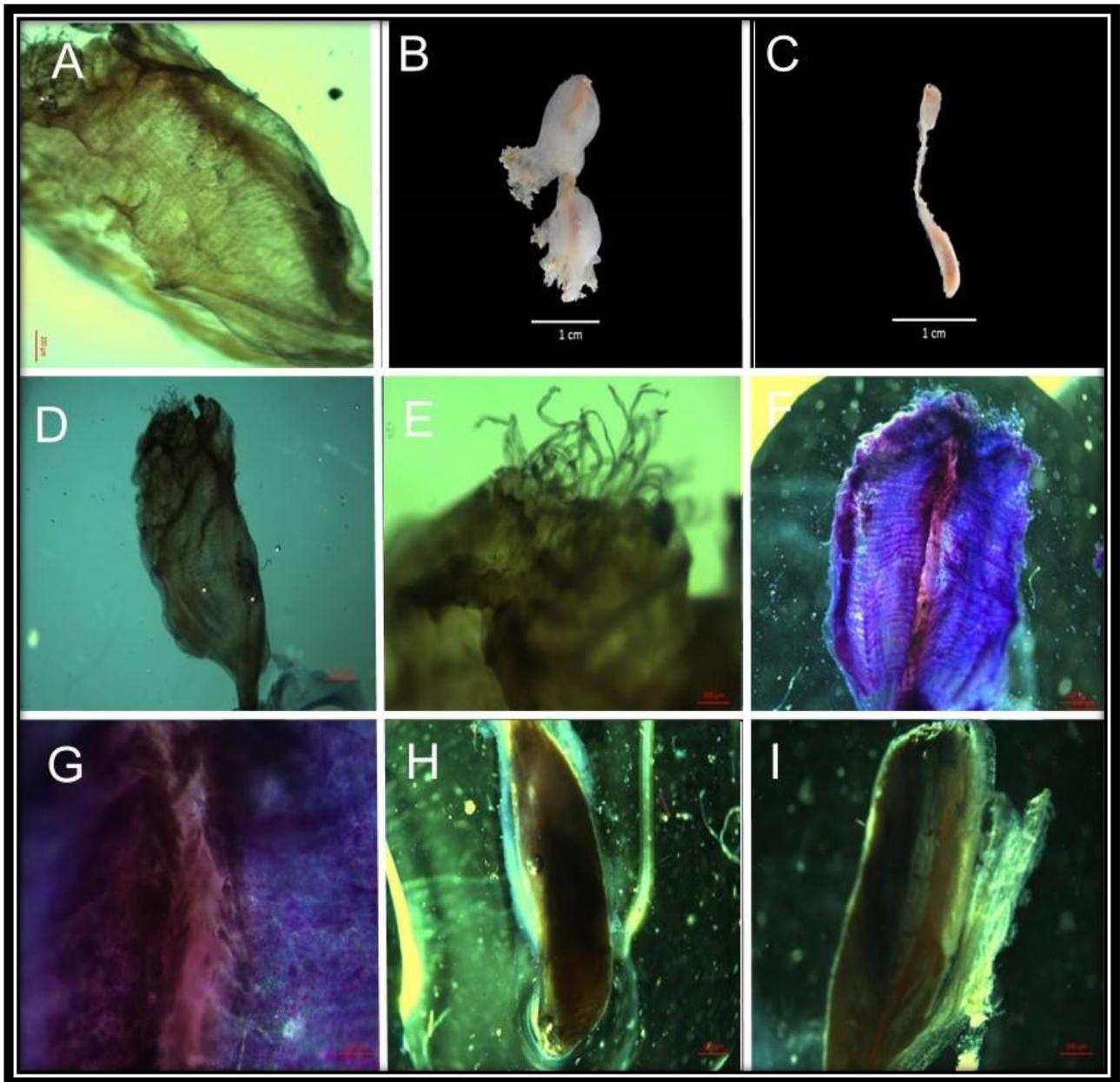


Lámina 1. *Diazona* aff. *carnosus* Monniot y Monniot, 1996: A) Musculatura; B) Individuo con túnica; C) Individuo sin túnica; D) Sifones; E) Tentáculos orales; F) Individuo disectado; G) Vasos longitudinales; H) Área abdominal; I) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Género *Rhopalaea* Philippi, 1843

***Rhopalaea abdominalis* (Sluiter, 1898)**

Lámina 2.

Sinonimia: *Ciona abdominalis* Sluiter, 1898

Material examinado: LEB-125; Nayarit-Bahía de Banderas-Tecuchitán; Lat. 20°43'55.2", Long. 105°24'43.2"; 05/10/2002; Intermareal. SEM-TUN-304; Oaxaca-Puerto Ángel-Playa Estacahuite; Lat. 15°40'8.06", Long. 96°28'53.54"; 16/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-331; Oaxaca-Puerto Ángel -Playa Tijera; Lat. 15°41'5.07", Long. 96°26'32.36"; 16/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-333; Oaxaca-Puerto Ángel-Playa Tijera; Lat. 15°41'5.07", Long. 96°26'32.36"; 14/05/2016; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de 3.1 cm de longitud y 0.8 cm de ancho de forma alargada, con la parte superior más amplia que la inferior. La túnica es firme y cartilaginosa, con una coloración rosada en conservación (Lámina 2. A). Posee incrustaciones de conchas en la base.

Los sifones se encuentran próximos (Lámina 2. B), ambos poseen 6 lóbulos de forma triangular-alargada y con manchas de pigmentos amarillos en forma de puntos (Lámina 2. C). El sifón oral tiene 0.07 mm de longitud, presenta un velo (Lámina 2. D) y posee aproximadamente 69 tentáculos en forma recta de aproximadamente 0.46 mm de longitud (Lámina 2. E), además posee un anillo simple y un área peritubercular profunda en forma de V, con un tubérculo dorsal en forma de embudo con un tamaño de 0.19 mm de longitud y 0.09 mm de ancho (Lámina 2. F). Mientras que el sifón atrial es de 0.62 mm de longitud. El manto es delgado (Lámina 2. G), con poca musculatura, posee bandas longitudinales curvadas hacia la línea ventral, las cuales se curvan convirtiéndose en transversales, mientras que ambos sifones presentan musculatura circular conspicua de manera interna y musculatura longitudinal superficial.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

La faringe es simple, no posee pliegues ni vasos parastigmáticos, presenta 4 estigmas por malla, aproximadamente 29 vasos longitudinales completos en cada lado y 105 vasos trasversales (Lámina 2. H y I). Además, posee una lámina dorsal simple, entera con un margen con aproximadamente 38 lengüetas. La apertura del esófago se encuentra después de la faringe. El área abdominal se encuentra encapsulada en una capa más dura que el resto de la túnica, cuya forma es alargada, estrecha y ovalada (Lámina 2. J). Las gónadas se encuentran enseguida del bucle intestinal (Lámina 2. K). El ganglio neuronal entre ambos sifones (Lámina 2. L).

Distribución geográfica: La especie fue descrita por primera vez en “Isla Tortuga”, Venezuela (Sluiter, 1898). Posteriormente fue registrada en: “Albatros”, Golfo de México y “Fish Hawks”, Golfo de Florida (Van Name, 1945); Isla Guadeloupe (Monniot, 1983); y en Nayarit, Jalisco, Guerrero y Oaxaca (Pacífico mexicano) en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

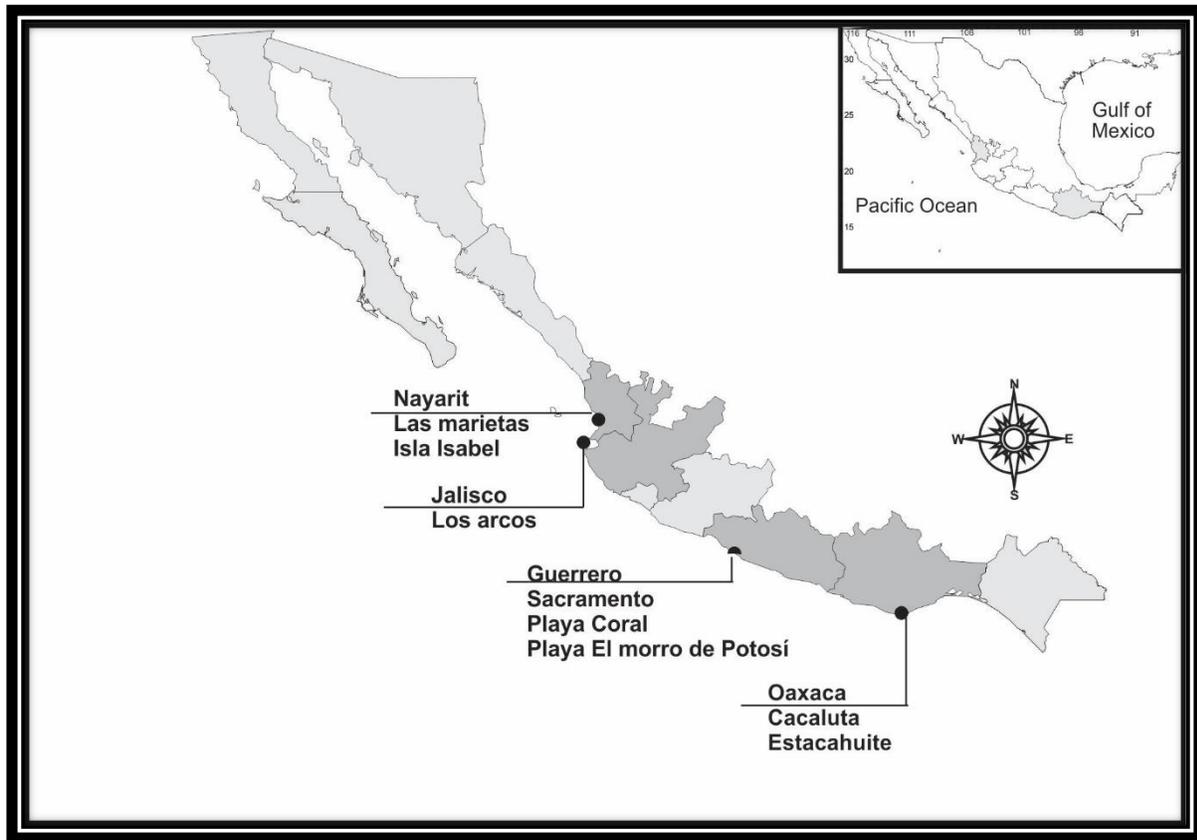


Ilustración 7. Distribución geográfica de *Rhopalaea abdominalis* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: Los ejemplares examinados coinciden con la descripción realizada por Van Name (1945). Sin embargo, existen pequeñas diferencias en su descripción con respecto a los individuos analizados en el presente estudio, tales como: la longitud y forma de los individuos del Pacífico mexicano que son más alargados y menos anchos, además presentan un mayor número de tentáculos orales y estigmas, tres veces más que los observados por Van Name (1945). Estas últimas variaciones pueden ser atribuidas precisamente a que nuestros organismos son más alargados. Con este estudio se registra por primera vez la especie para el Pacífico Oriental.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

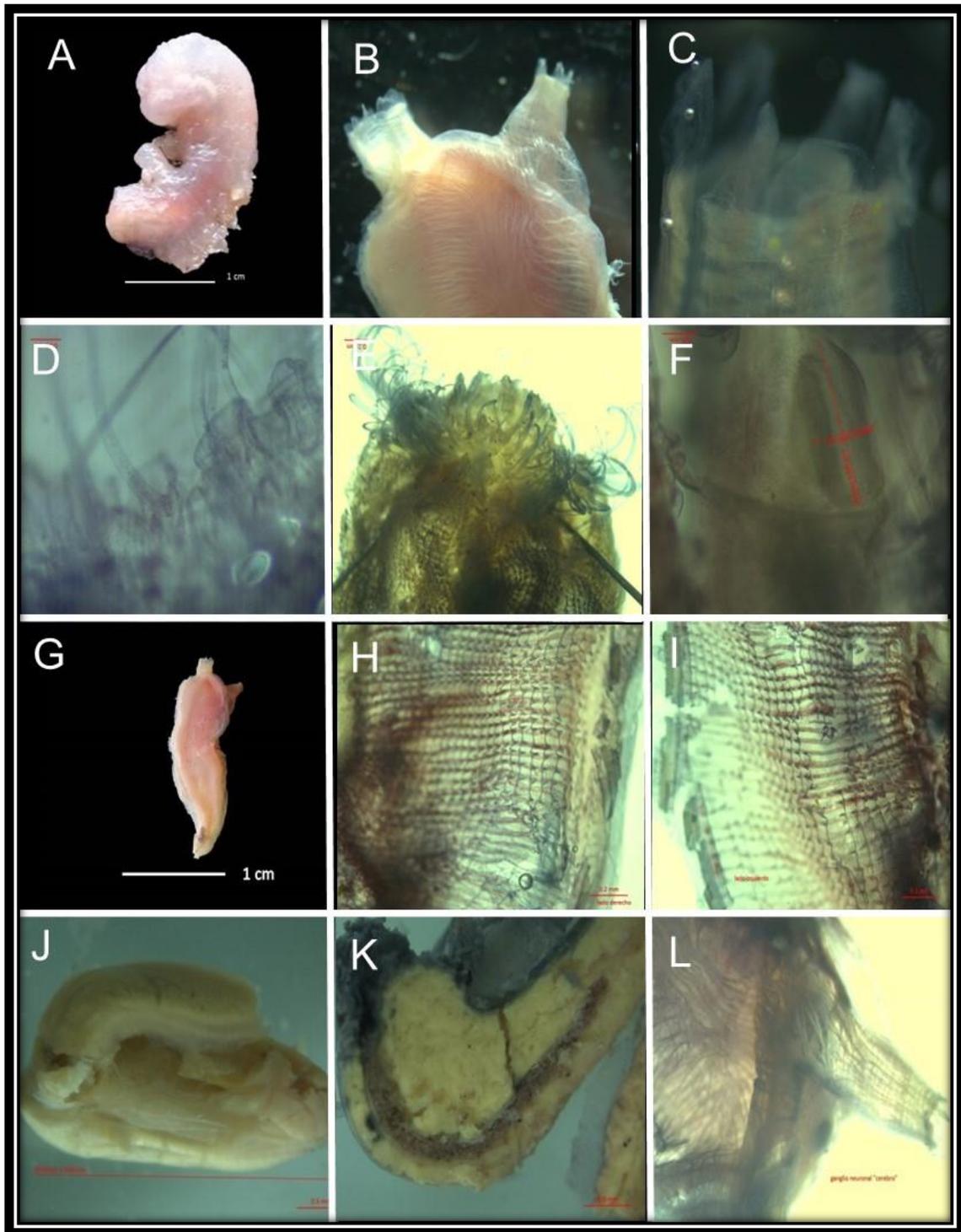


Lámina 2. *Rhopalaea abdominalis* (Sluiter, 1898): A) Individuo con túnica; B) Sifones y musculatura; C) Lóbulos orales y pigmentos; D) Tentáculos orales; E) Velo; F) Tubérculo dorsal; G) Individuo sin túnica; H); H) Faringe: lado izquierdo; I) Faringe: lado derecho; J) Abdomen; K) Gónadas; L) Ganglio neuronal.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Rhopalaea birkelandi* Tokioka, 1971**

Lámina 3.

Sinonimias: *Rhopalaea birkelandi* Tokioka, 1971

Material examinado: LEB- 200; Nayarit-Bahía de Banderas-Majahuitas; Lat. 20°44'42", Long. 105°23'34", 08/06/2003; Intermareal. SEM-TUN-320; Oaxaca-Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11.36", Long. 96°09'48.28"; 14/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-323; Oaxaca-Puerto Ángel-Muelle; Lat. 15°39'49.48", Long. 96°29'44.62"; 04/11/2015; Intermareal. SEM-TUN-324; Oaxaca-Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11.36", Long. 96°09'48.28"; 14/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-345; Jalisco-Mismaloya-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/18; Intermareal. SEM-TUN-395; Guerrero-Zihuatanejo-Sacramento; Lat. 17°37'55.82", Long. 101°36'36.79"; 27/01/18. Intermareal. SEM-TUN-420; Guerrero-Acapulco-Playa Manzanillo; Lat. 17°37'10.74", Long. 101°31'26.17"; 28/01/18. Intermareal. SEM-TUN-412; Guerrero-Zihuatanejo-Playa Las Gatas; Lat. 17°37'16.94", Long. 101°33'10.27"; 27/01/18. Intermareal. SEM-TUN-420; Guerrero-Acapulco-Playa Manzanillo; Lat. 17°37'10.74", Long. 101°31'26.17"; 28/01/18. Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de 4.2 cm de longitud y 1.6 cm de ancho (ancho uniforme a lo largo), con forma alargada y con una coloración morada en estado de conservación. Túnica firme y cartilaginosa (Lámina 3. A), no posee incrustaciones, sin proyecciones y presencia de comensales en la faringe: anfípodos, poliquetos y copépodos. Sin túnica la forma del zooide es rectangular con una ligera proyección hacia el estómago (Lámina 3. B).

Los sifones son cortos y pequeños, se encuentran próximos entre sí (Lámina 2. C), ambos poseen 6 lóbulos de forma triangular-alargada (Lámina 3. D) y con manchas de pigmentos amarillos en forma de puntos. Además, ambos presentan musculatura circular conspicua de manera interna y musculatura longitudinal superficial. El sifón oral tiene 0.14 mm de longitud, presenta un velo y posee aproximadamente 48 tentáculos en

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

forma recta de aproximadamente 0.05 mm de longitud, mientras que el sifón atrial es más amplio y mide 0.23 mm de longitud (Lámina 3. E).

El área peritubercular en forma de “V”, con un tubérculo dorsal en forma de embudo, este con un tamaño de 0.26 mm de longitud y 0.05 mm de ancho (Lámina 3. F). La glándula neural se encuentra detrás del ganglio (Lámina 3. G)

La faringe es simple, no posee pliegues ni vasos parastigmáticos, presenta 4 estigmas lisas por malla (Lámina 3. H y I), aproximadamente 26 vasos longitudinales completos de lado derecho, 29 de lado izquierdo y 105 vasos trasversales. Presencia de papilas faríngeas soportadas en los vasos longitudinales. Además, posee una lámina dorsal simple, entera con un margen con 97 lengüetas. La apertura del esófago se encuentra después de la faringe.

En el área abdominal, se encuentra un esófago corto de forma alargada, pared lisa y de tamaño extremadamente pequeño (Lámina 3. J). El ano es multilobado (Lámina 3. K). Las gónadas se encuentran embebidas en el asa intestinal (Lámina 3. L).

Distribución geográfica: La especie fue descrita por primera vez en Playas del Coco, Costa Rica (Tokioaka, 1971). Posteriormente se registró en el Pacífico mexicano: en el Golfo de California (Carballo, 2006; Moreno-Dávila, 2013), en la Costa de Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010 y presente estudio), en Nayarit, Jalisco y Guerrero, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”



Ilustración 8. Distribución geográfica de *Rhopalaea birkelandi* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: Las características morfológicas (externas e internas) observadas en este ejemplar coinciden con la descripción realizada por Tokioka en 1971, por lo cual se puede decir que morfológicamente se trata de la misma especie. Además, esta especie ha sido previamente registrada en las costas de Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010) y Golfo de California (Carballo, 2006), en el presente estudio es registrada por primera vez en la costa de Nayarit, Jalisco y Guerrero.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

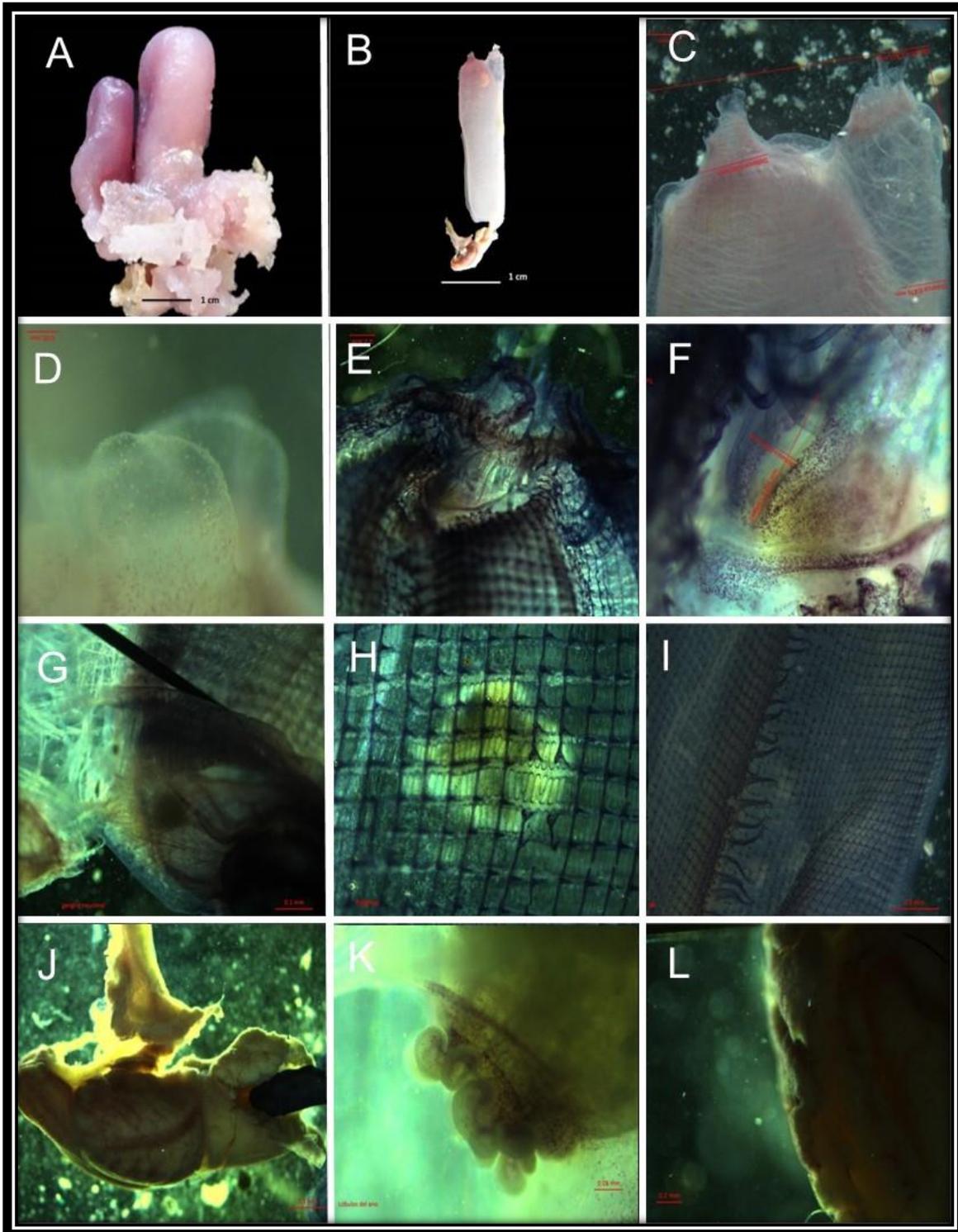


Lámina 3. *Rhopalaea birkelandi* Tokioka, 1971: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica; C) Sifones; D) Lóbulos; E) Tentáculos orales; F) Tubérculo dorsal; G) Glándula neuronal; H) Estigmas; I) Lámina dorsal; J) Abdomen; K) Lóbulos anales; L) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Familia Didemnidae Giard, 1872

Género *Didemnum* Savigny, 1816

***Didemnum* sp.**

Lámina 4.

Material examinado: LEB-36; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56" Long. 105°35'06"; 10/06/2003. Intermareal; 79; Oaxaca-Puerto Ángel; Lat. 15°39'49", Long. 96°29'44"; 05/12/2002; 1.5 metros. SEM-TUN-217; Nayarit-Santiago Ixcuitla-Isla Isabel; Lat. 21°52'30" N, Long. 105°54'54" W; 23/09/2014; Intermareal. SEM-TUN-305; Oaxaca-Puerto Angel-Estacahuite; Lat. 15°40'08", Long. 96°28'53"; 16/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-314; Oaxaca-Puerto Ángel-Estacahuite; Lat. 15°40'08", Long. 96°28'53"; 04/11/2015; Intermareal. SEM-TUN-330; Oaxaca-Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11", Long. 96°09'48"; 14/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-360; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-364; Jalisco-Puerto Vallarta-Playa Los Arcos; Lat. 20°32'37", Long. 105°17'16"; 23/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-378; Nayarit-Bahía de Banderas-Túnel Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-393; Guerrero-Zihuatanejo-Sacramento; Lat. 17°37'55", Long. 101°36'36"; 27/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-396; Guerrero-Zihuatanejo-Playa Coral; Lat. 17°40'28", Long. 101°39'22"; 27/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-415; Guerrero-Zihuatanejo-El Morro de Potosí; Lat. 17°32'03", Long. 101°30'05"; 28/01/18; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial de forma masiva y de color blanco (preservado) (Lámina 4. A). En la túnica, posee espículas en forma estelada de aproximadamente 25 µm de diámetro, con rayos muy bien definidos (Lámina 4. D), pero poco proyectados, en la base se encuentran adheridas partículas de carbonato de calcio (Lámina 4. C).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Los zooides son de color amarillo ocre (preservados) y se encuentran totalmente embebidos en la túnica (Lámina 4. B), son pequeños, de aproximadamente 2 mm de largo y 0.5 mm de ancho. Poseen 2 divisiones corporales: tórax (Lámina 4. E) y abdomen (Lámina 4. F). El sifón oral se encuentra en posición de 90°, mientras que el sifón atrial es una apertura que se abre en sistemas cloacales, dejando al descubierto algunas hileras de estigmas. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe. El espermiducto en forma de espiral de 332.79 µm de diámetro.

Distribución geográfica: En el Pacífico mexicano: En Nayarit, Jalisco, Guerrero y Oaxaca, en el presente estudio. Comentarios taxonómicos del género, véase más adelante.

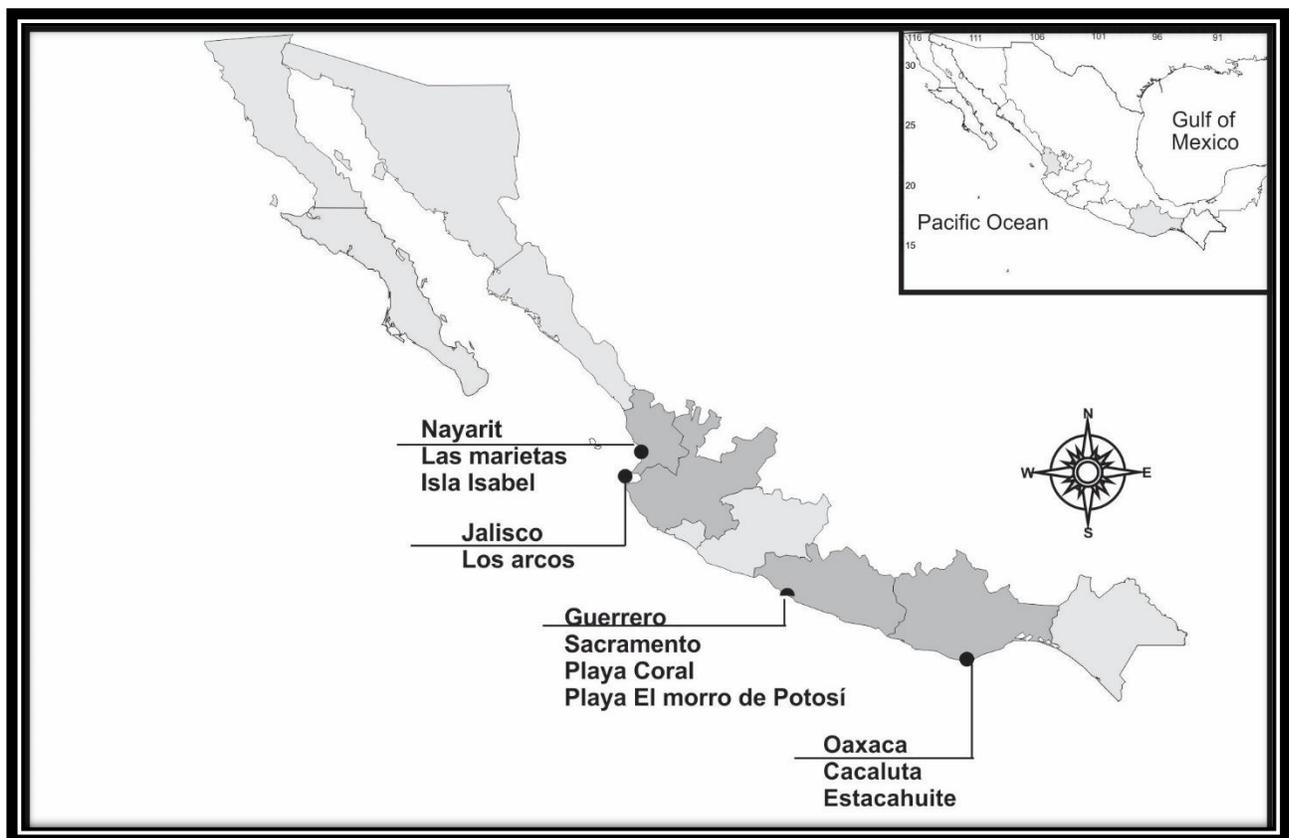


Ilustración 9. Distribución geográfica de *Didemnum* sp. en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

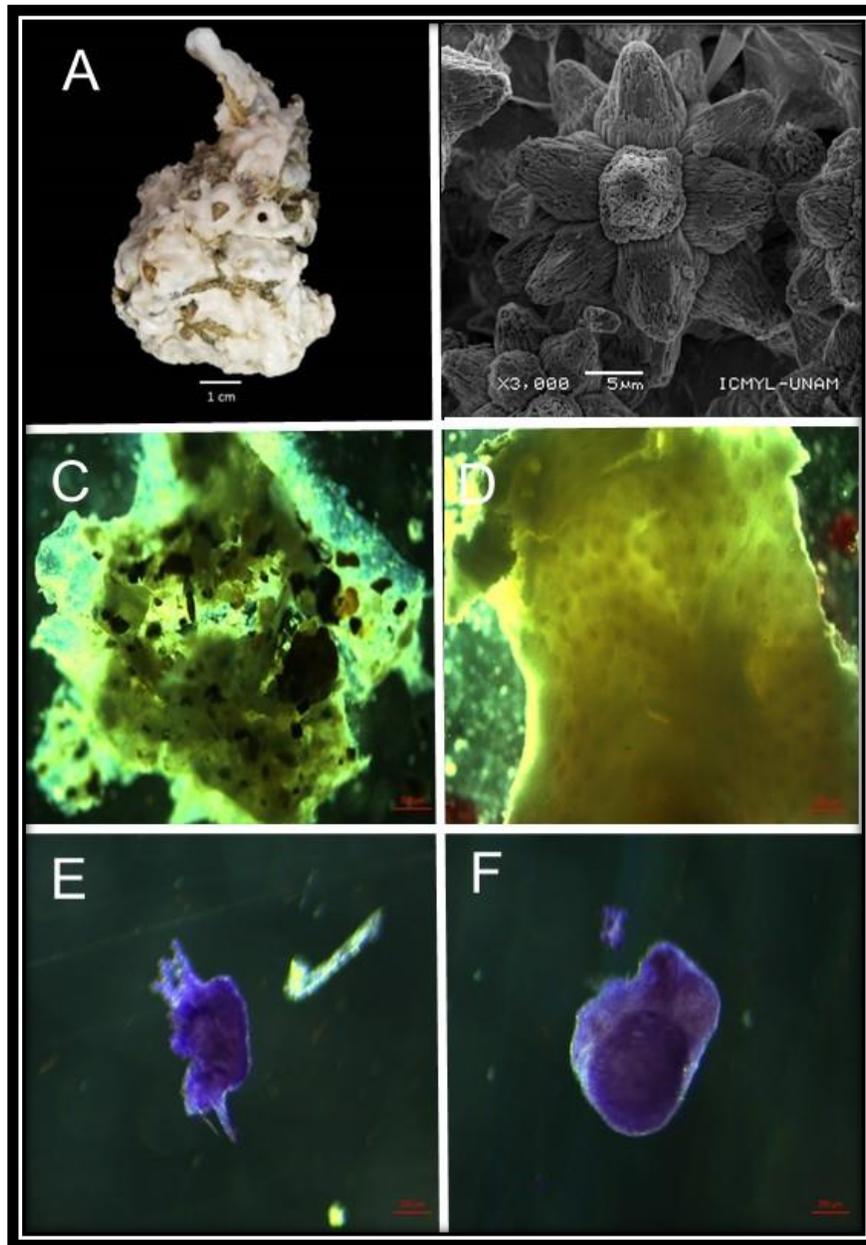


Lámina 4. *Didemnum* sp.: A) Colonia adherida al sustrato; B) Espículas; C) Partículas de carbonato de calcio; D) Colonia sin sustrato; E) Zooide: tórax; D) Zooide: Tórax; F) Zooide: estómago.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Didemnum aff. recurvatum* Sluiter, 1909**

Lámina 5.

Material examinado: LEB-37; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 04/10/2002; Intermareal. SEM-TUN-261; Baja California Sur-La Paz-Caleritas; Lat. 24°21'15", Long. 110°16'58"; 20/08/2017; Intermareal. SEM-TUN-262 y 263; Sinaloa-Mazatlán-Isla Pájaros; Lat. 23°15'00", Long. 106°28'33"; 27/11/2017. SEM-TUN-301; Oaxaca-Puerto Ángel-Playa Tijera; Lat. 15°41'05", Long. 96°26'32"; 16/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-302; Oaxaca- Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11", Long. 96°09'48"; 14/05/2016; Intermareal. SEM-TUN- 303; Oaxaca-Puerto Ángel-Playa Tijera; Lat. 15°41'05", Long. 96°26'32"; 16/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-308; Oaxaca-Puerto Ángel-Playa Tijera; Lat. 15°41'05", Long. 96°26'32"; 16/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-312; Oaxaca- Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11", Long. 96°09'48"; 14/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-315; Oaxaca-Huatulco-La Entrega; Lat. 15°44'40", Long. 96°07'43"; 15/05/2016. Intermareal. SEM-TUN-318; Oaxaca- Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11", Long. 96°09'48"; 14/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-327; Oaxaca-Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11", Long. 96°09'48"; 14/05/2016; Intermareal. SEM-TUN- 335; Oaxaca-Puerto Ángel-Playa Tijera; Lat. 15°41'05", Long. 96°26'32"; 16/05/2016; Intermareal. SEM-TUN-338; Oaxaca-Huatulco-San Agustín; Lat. 15°41'15.90"N, Long. 96°14'15.91"; 14/05/16; Intermareal. SEM-TUN-355; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-356; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-361; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-368; Jalisco-Puerto Vallarta-Playa Los Arcos; Lat. 20°32'37", Long. 105°17'16"; 23/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-374; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-414; Guerrero-Zihuatanejo-El morro de Potosí; Lat. 17°32'03", Long. 101°30'05"; 28/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-407; Guerrero-Zihuatanejo-Zacatoso; Lat. 17°39'13", Long. 101°37'19"; 27/01/2018; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial, color marrón en estado de preservación (Lámina 5. A y B). Posee espículas en forma estelada de aproximadamente 17.5 μm de diámetro, con rayos muy bien definidos, pero poco proyectados (Lámina 5. C). La túnica es traslúcida.

Los zooides son de color amarillo ocre (preservados) y se encuentran totalmente embebidos en la túnica, son pequeños, de aproximadamente 1.5 mm de largo y 0.5 mm de ancho (Lámina 5. D). Poseen 2 divisiones corporales: tórax y abdomen. El sifón oral se encuentra en posición de 90°, mientras que el sifón atrial es una apertura circular que se abre en sistemas cloacales. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe. El abdomen es muy ancho, incluso mayor que el área torácica. El espermiducto en forma de espiral de aproximadamente 473.981 μm de diámetro. Proceso muscular corto.

Distribución geográfica: La especie *Didemnum recurvatum* fue registrada por primera vez en Indonesia (Sluiter, 1909). Posteriormente fue registrada en el Indo-Pacífico: en costas de Australia, Filipinas y archipiélago Sulu (Millar, 1975). Mientras que, en costas del Pacífico mexicano se detectó por primera vez su presencia en la costa de Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010), la cual se confirmó en el presente estudio para dicha zona y además se encontró en costas de Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Guerrero. Comentarios taxonómicos del género, véase más adelante.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

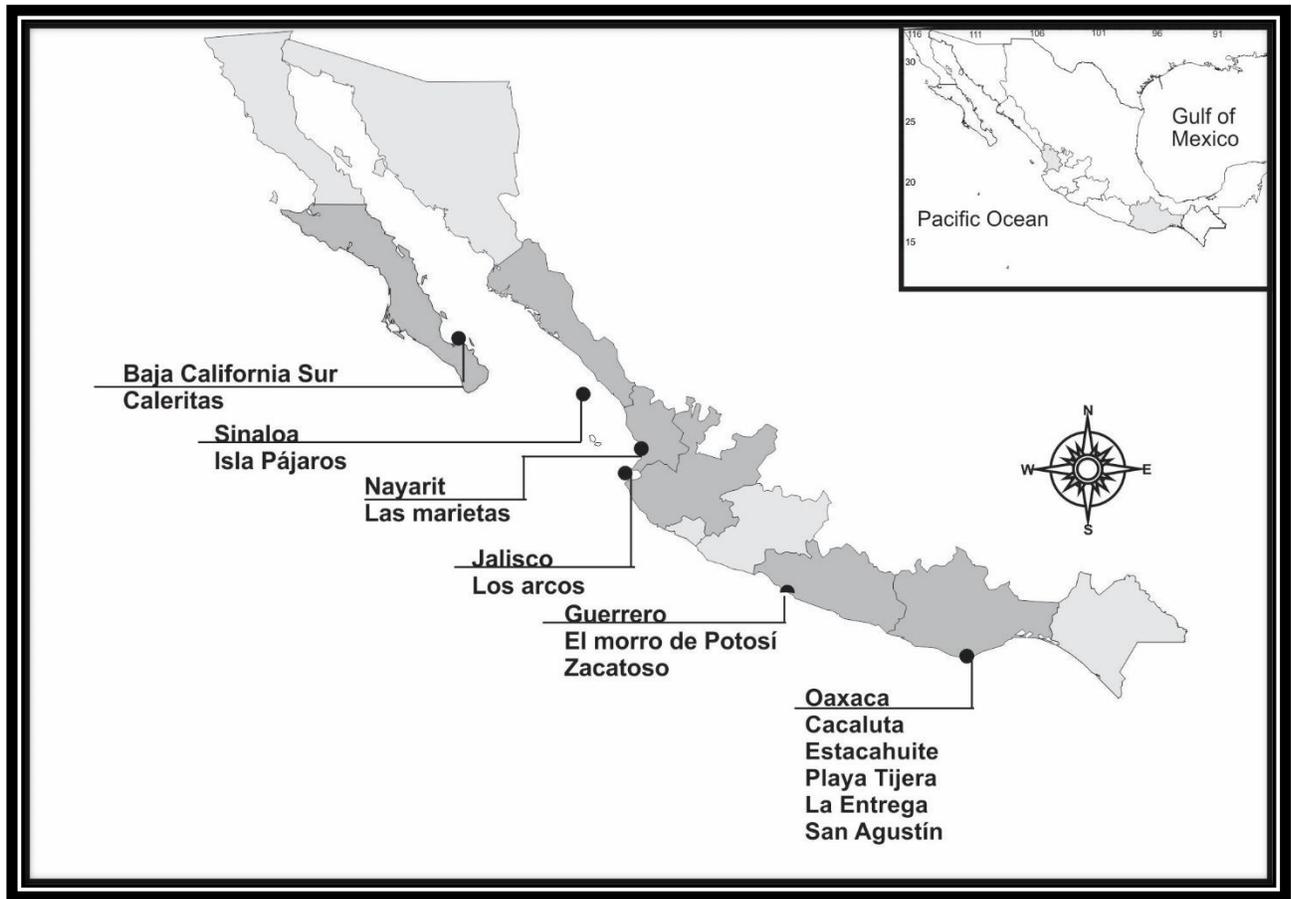


Ilustración 10. Distribución geográfica de *Didemnum* aff. *recurvatum* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

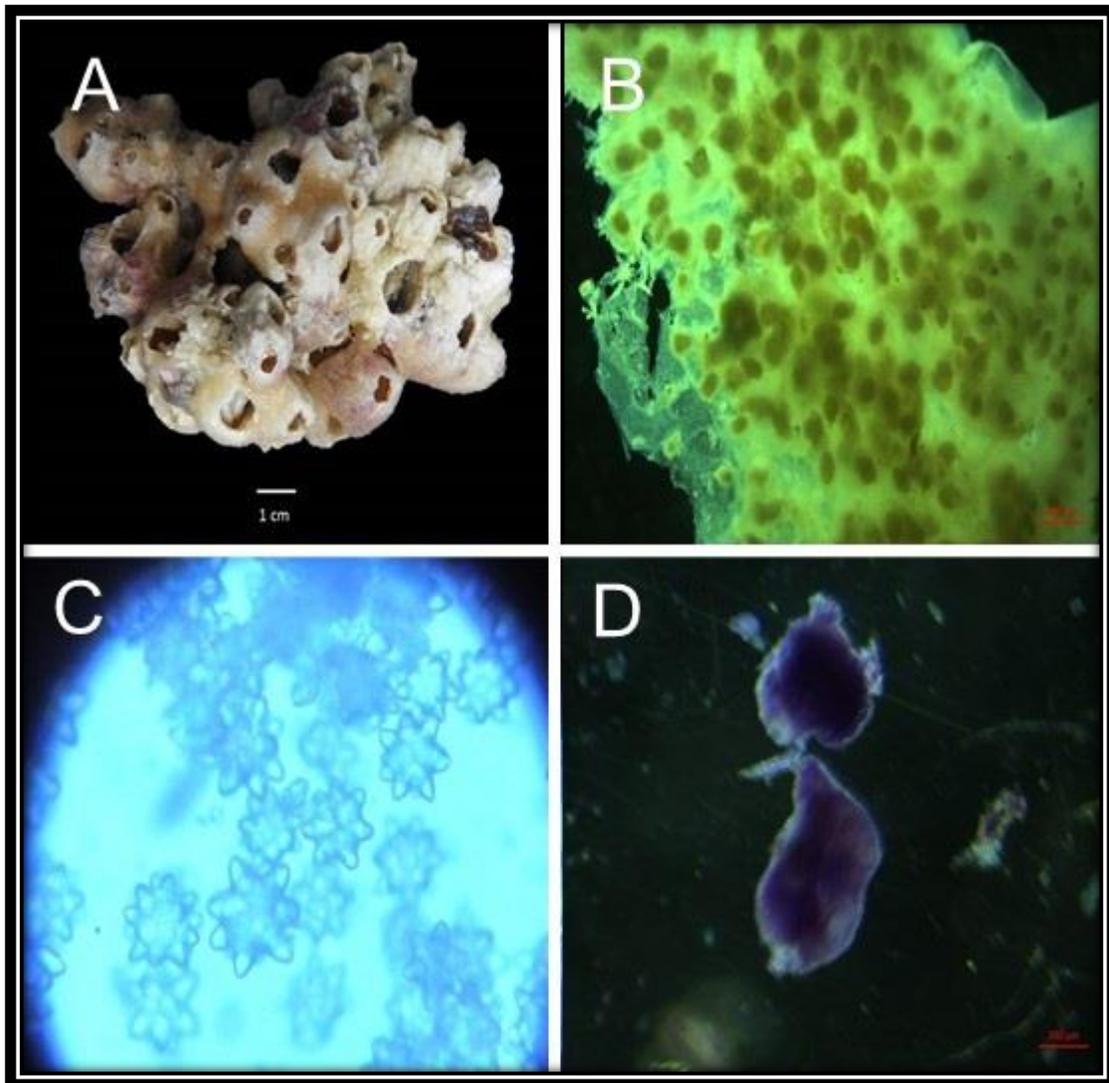


Lámina 5. *Didemnum* aff. *recurvatum* Sluiter, 1909: A) Colonia adherida al sustrato; B) Colonia sin sustrato; C) Espículas; D) Zooide.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Didemnum vanderhorsti* Van Name, 1924**

Lámina 6.

Material examinado: LEB-78; Oaxaca-Puerto Ángel; Lat. 15°39'49", Long. 96°29'44"; 05/12/2002; 1.5 metros. SEM-TUN-311; Oaxaca-Puerto Ángel-Cacaluta; Lat. 15°43'11", Long. 96°09'48"; 04/11/2015; Intermareal. SEM-TUN-351; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-363; Jalisco-Puerto Vallarta-Playa Los Arcos; Lat. 20°32'37", Long. 105°17'16"; 23/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-379; Nayarit-Bahía de Banderas-Túnel Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-383; Nayarit-Bahía de Banderas-Túnel Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-386; Sinaloa-Mazatlán-Isla Pájaros; Lat. 23°15'00", Long. 105°17'16"; 11/07/2014; Intermareal. SEM-TUN-392; Guerrero-Zihuatanejo-Sacramento; Lat. 17°37'55", Long. 106°28'33"; 27/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-397; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-404; Guerrero-Zihuatanejo-Zacatoso; Lat. 17°39'13", Long. 101°37'19"; 27/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-408 y 409; Guerrero-Zihuatanejo-La Caleta de Chon; Lat. 17°32'03", Long. 101°30'05"; 27/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-418; Guerrero-Zihuatanejo-Riscalillo; Lat. 17°37'17", Long. 101°31'18"; 28/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-419; Guerrero-Zihuatanejo-Playa Manzanillo; Lat. 17°37'10", Long. 101°31'26"; 28/01/2018; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial, color blanco (preservado) (Lámina 6. A y B). Posee espículas en forma estelada de aproximadamente 30 µm de diámetro, con rayos muy bien definidos y proyectados (Lámina 6. C). La túnica es muy densa, poseía un poliqueto en la superficie.

Los zooides son de color amarillo pálido (preservados) y se encuentran totalmente embebidos en la túnica, son pequeños, de aproximadamente 1.5 mm de largo y 0.6 mm de ancho. Poseen 2 divisiones corporales: tórax (Lámina 6. D) y abdomen (Lámina 6. E). El sifón oral se encuentra en posición de 90°, mientras que el sifón atrial es una apertura

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

que deja al descubierto algunas filas de estigmas y se abre en sistemas cloacales. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe. El abdomen es muy ancho, el estómago es muy grande y surge como si fuera una protuberancia, el intestino se encuentra saturado de material orgánico. El espermiducto en forma de espiral de aproximadamente 473.98 μm de diámetro. Musculatura en proceso larga de 1.1 mm de longitud. La colonia se encontraba en reproducción, se encontraron varias larvas (Lámina 6. F).

Distribución geográfica: La especie *Didemnum vanderhorsti* fue registrada por primera vez en el mar Atlántico en Curacao (Van Name, 1924). Posteriormente fue registrada en Florida y Jamaica (Van Name, 1945) y en el Golfo de México (Cole y Lambert, 2009). En el Océano Pacífico se ha registrado en Bahía Concepción, Golfo de California, Panamá (Van Name, 1945), Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010), Nayarit, Jalisco, Guerrero y se confirmó su presencia en Oaxaca, en el presente estudio (Ilustración 11).

Código de Barras de ADN: Se alinearon 3 secuencias de 650 pb que resultaron idénticas entre ellas, estas son representativas de los ejemplares SEM-TUN-386, SEM-TUN-408 Y SEM-TUN-409. Al comparar la secuencia con sus similares disponibles en Gen Bank, se observó que esta difiere en 16% a la secuencia más cercana que es un *Didemnum candidum* (Núm. de acceso AY116602.1).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

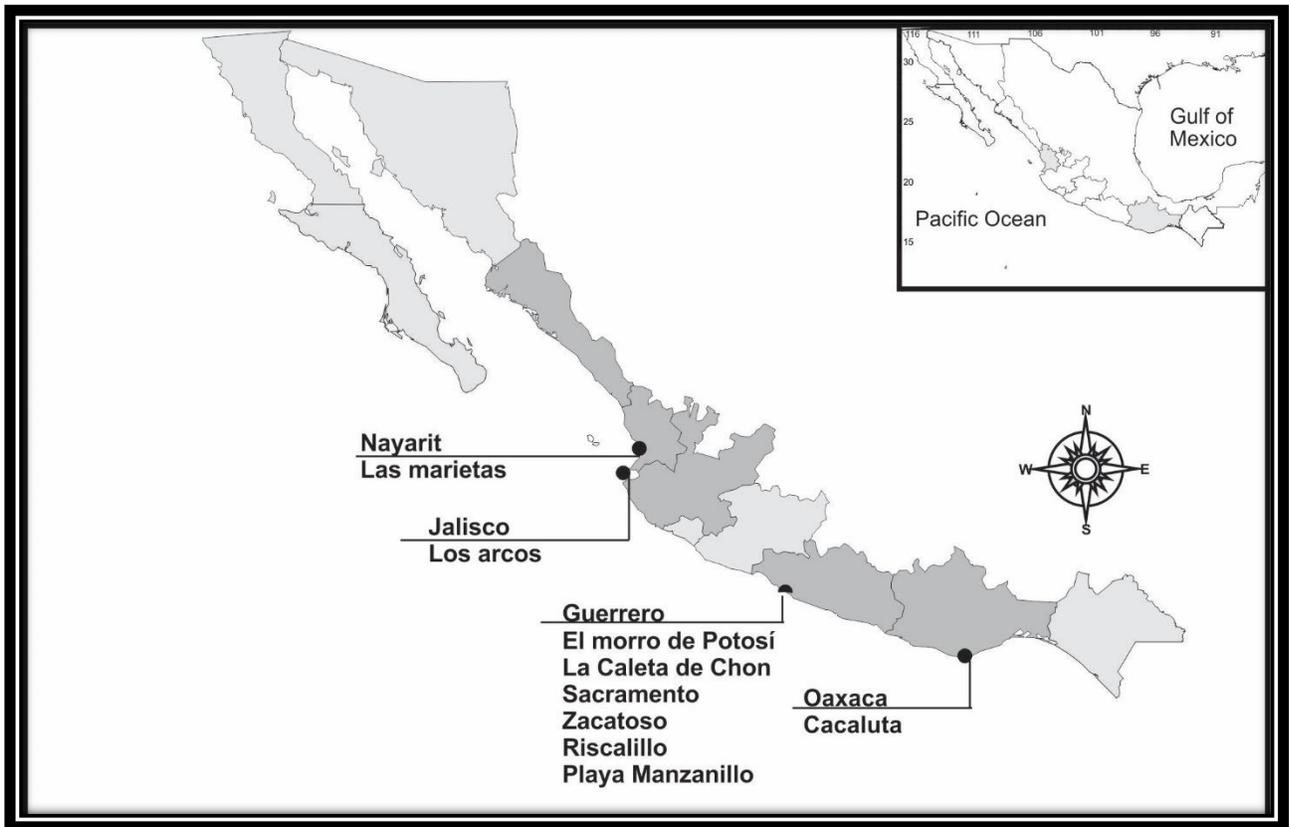


Ilustración 11. Distribución geográfica de *Didemnum vanderhorsti* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

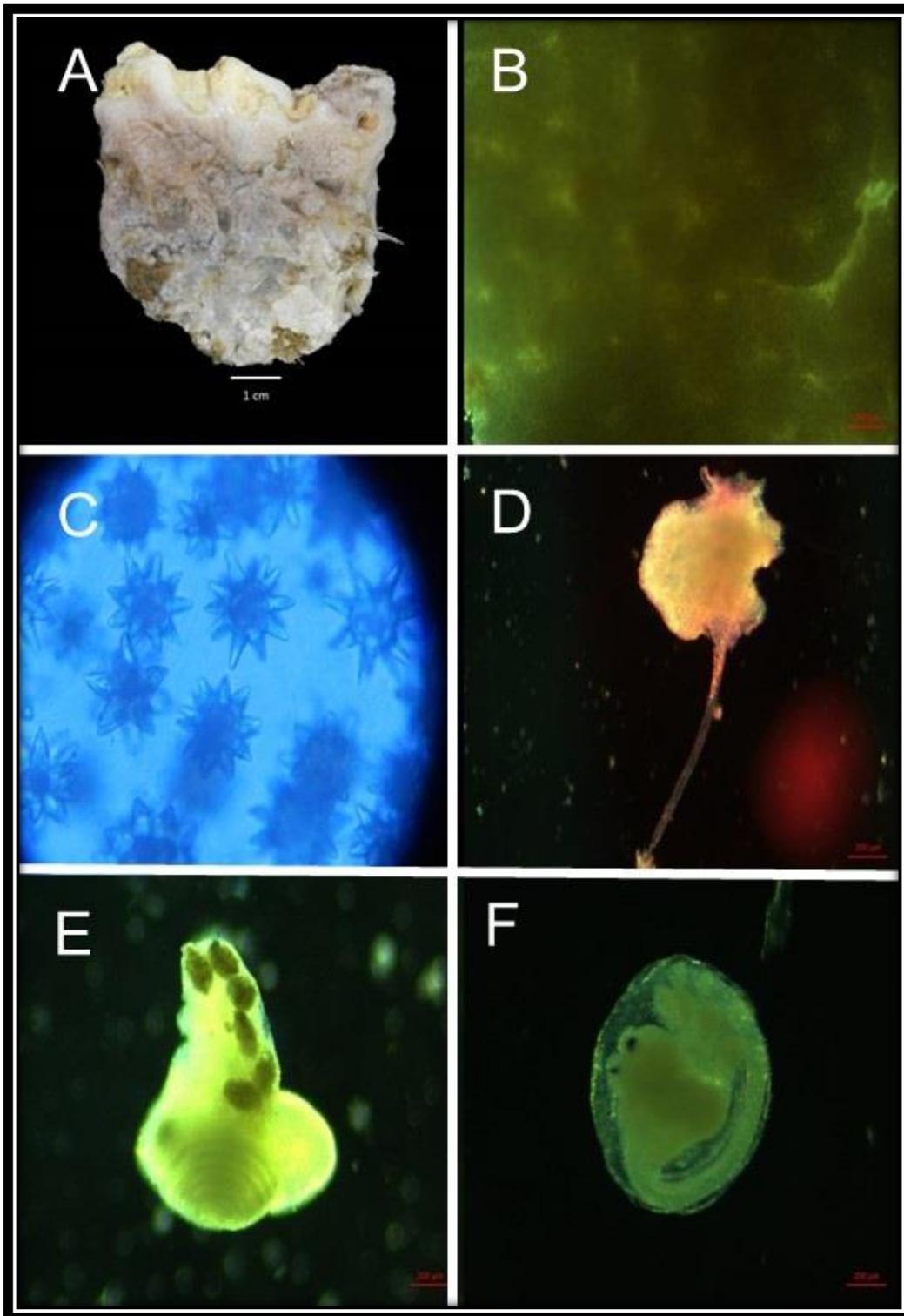


Lámina 6. *Didemnum vanderhorsti* Van Name, 1924: A) Colonia adherida al sustrato; B) Colonia sin sustrato; C) Espículas; D) Zooide: Tórax; E) Zooide: Estómago; F) Larva.

Comentarios taxonómicos del género *Didemnum*: El género *Didemnum* es uno de los más diversos de la clase Ascidiacea, que de acuerdo con el registro mundial de especies marinas (WORMS) posee 331 especies válidas, las cuales se han registrado principalmente en costas del Atlántico. Mientras tanto, en el Pacífico se han registrado principalmente en el área del Indo-pacífico y Pacífico norte. Pero, específicamente en costas mexicanas solo se han registrado algunas especies: *D. recurvatum* y *D. vanderhorsti*, en las costas de Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010). En este trabajo, se comprobó las dos especies para la misma zona. Además, se amplió su registro hacia las costas de Nayarit, Jalisco y Guerrero.

Las colonias analizadas fueron identificadas hasta el mínimo nivel taxonómico posible, esto debido a su pequeño tamaño y a la complejidad derivada de la contracción de los zooides, lo cual dificulta la observación de las características internas. Pese a ello, los ejemplares observados se diferenciaron de otras especies debido a la morfología del zooides, específicamente en: lo largo del sifón oral y la forma de los lóbulos, la apertura branquial, la forma del estómago, en la forma y tamaño de las espículas, todo este conjunto de características difiere del resto de los individuos analizados (Tabla 4.). Debido a estas características se pudo identificar a *Didemnum* sp., *D. recurvatum*, *D. vanderhorsti*. Sin embargo, solo en un ejemplar se pudo contar con la larva (*D. vanderhorsti*), la cual sirvió para la corroboración de la especie, en los otros dos casos, no pudo ser posible.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 4. Comparación de las principales características entre las especies del género, presentes en las costas del Pacífico mexicano: *Didemnum* sp.1, *Didemnum* aff. *recurvatum* y *Didemnum vanderhorsti*.

Características observadas	<i>Didemnum</i> sp. 1	<i>Didemnum</i> aff. <i>recurvatum</i>	<i>Didemnum vanderhorsti</i>
Color de la colonia	Blanco	Marrón	Blanco
Tamaño del zooide (largo/ancho)	1728.904 µm 499.562 µm	1351.21 µm 484.207 µm	1526.000 µm 611.735 µm
Lóbulos orales	Triangulares, alargados	Ondulados, cortos	Ligeramente triangulares, cortos
Sifón atrial	Apertura	Tubo circular	Apertura
Número de giros del espermiducto	6	6	7
Proceso muscular	Muy corto	Corto	Largo
Espículas	25 µm, poco proyectadas	17.5 µm, poco proyectadas	30 µm, bien proyectadas

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Género *Trididemnum* Della Valle, 1881

Trididemnum savignii (Heller, 1886)

Lámina 7.

Material examinado: LEB-70; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 04/10/2002; Intermareal. SEM-TUN-266 y 267; Sinaloa-Mazatlán-Isla Pájaros; Lat. 23°15'00", Long. 105°17'16"; 11/07/2014; Intermareal.

Sinonimias: *Aplidium pullum* (Sluiter, 1898); *Didemnum atrocanum* Van Name, 1902; *Didemnum lucidum* Van Name, 1902; *Didemnum porites* Van Name, 1902; *Didemnum savignii* Herdman, 1886; *Didemnum tenebricosum* Sluiter, 1909; *Polyclinum pullum* Sluiter, 1898; *Tridentemnum savignii* (Herdman, 1886); *Trididemnum atrocanum* (Van Name, 1902); *Trididemnum lucidum* (Van Name, 1902); *Trididemnum porites* (Van Name, 1902); *Trididemnum pullum* (Sluiter, 1898); *Trididemnum savigney* (Herdman, 1886); *Trididemnum savignyi* (Herdman, 1886).

Descripción morfológica: Espécimen colonial, color pardo después de estar en formol (Lámina 7. A) y azul-verdosa en vida. Posee espículas en forma estelada de aproximadamente 22.5 µm de diámetro, con rayos muy bien definidos poco proyectados (Lámina 7. B).

Los zooides son de color amarillo pálido y se encuentran totalmente embebidos en la túnica, son pequeños, de aproximadamente 1.2 mm de largo y 464.29 µm de ancho (Lámina 7. C). Poseen 2 divisiones corporales: tórax y abdomen. El área torácica presenta 3 hileras de estigmas. El sifón oral se encuentra en posición de 90°, mientras que el sifón atrial es una apertura que deja al descubierto algunas filas de estigmas y se abre en sistemas cloacales. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe. El abdomen es muy ancho, el estómago es muy grande y redondeado, muy notorio. El espermiducto en forma de

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

espiral. La colonia se encontraba en reproducción, presencia de larvas de aproximadamente 1.2 mm de longitud (Lámina 7. D).

Distribución geográfica: La especie ha sido registrada en costas del Atlántico: En Bermudas (Van Name, 1902), Florida, Bahía Biscay, Puerto Rico, Jamaica (Van Name, 1945) y en Australia (Kott, 2001). En las costas del Pacífico: en las islas Filipinas, Palau, Marianas, Hawaii (Tokiooka, 1967) y en el Pacífico mexicano: se ha detectado su presencia en la parte sur (Oaxaca) (Moreno-Dávila, 2010) y en la costa de Nayarit, en el presente estudio.

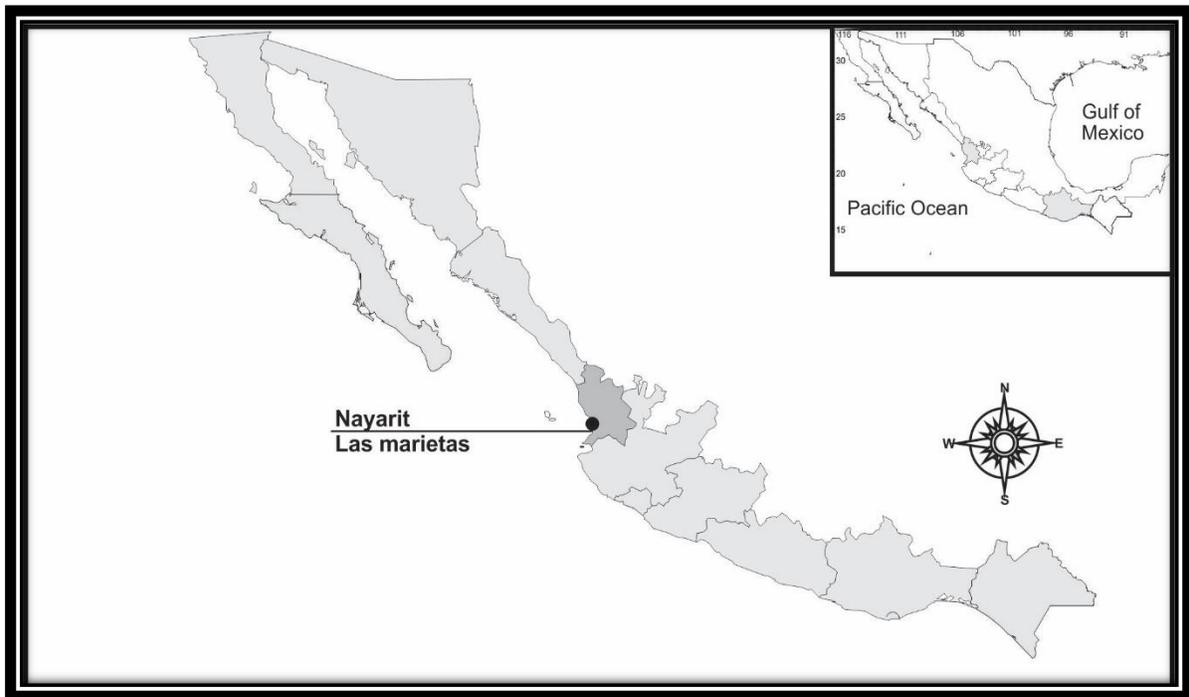


Ilustración 12. Distribución geográfica de *Trididemnum savignii*. en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: La colonia examinada coincide con un ejemplar descrito para la costa de Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010). Las principales características distintivas fueron: el número de hileras de estigmas, su coloración y la estructura del zooide.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Código de Barras: Se obtuvieron dos secuencias, que al ser alineadas resultaron idénticas entre sí, conformadas por 600 pb, representativas de los ejemplares SEM-TUN-266 Y SEM-TUN-267. Al comparar la secuencia con sus similares disponibles en Gen Bank, se observó que esta difiere en 17% a la secuencia más cercana que es un *Cystodytes dellechiaiei* (Núm. de acceso AY1523044.1).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

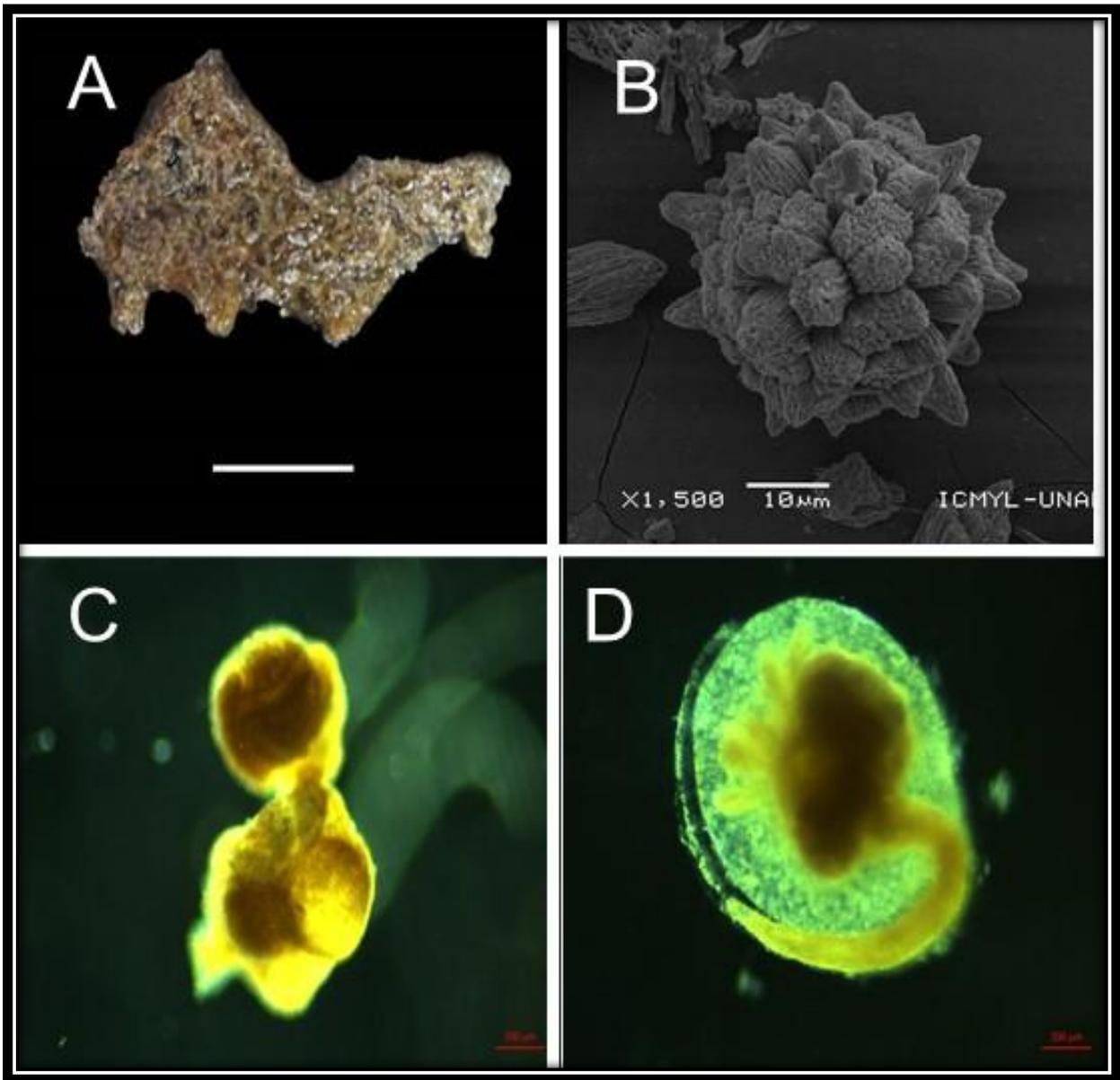


Lámina 7. *Trididemnum savignii*.: A) Colonia; B) Espículas; C) Zooide; D) Larva.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Familia Polycitoridae Michaelsen, 1904

Género *Eudistoma* Caullery, 1909

***Eudistoma* sp. 1**

Lámina 8.

Material examinado: LEB-20; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 04/10/2002; Intermareal. SEM-TUN-260; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 05/10/2002; Intermareal. SEM-TUN-348; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-359; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-381; Nayarit-Bahía de Banderas-Túnel Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-394; Guerrero-Zihuatanejo-Sacramento; Lat. 17°37'55", Long. 101°36'36"; 27/01/2018; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial de 1.7 cm de diámetro y 0.3 mm de grosor, cuya forma es de almohadilla con apariencia gelatinosa y coloración superficial beige (Lámina 8. A) en estado de preservación. La túnica es muy dura y no posee espículas.

Los zooides se encuentran totalmente embebidos en la túnica (Lámina 8. B y C) y no presentan un arreglo ordenado. Son muy pequeños, de aproximadamente 0.09 mm de largo y 390.96 µm de ancho. Poseen 2 divisiones corporales: tórax y abdomen. El tórax presenta 3 hileras de estigmas. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe. EL sifón oral es más largo que el atrial y posee lóbulos redondeados, mientras que el sifón atrial posee 5 lóbulos. La musculatura es muy notoria, presenta líneas longitudinales externas y longitudinales internas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Dentro de la misma colonia, los zooides presentan una alta variabilidad morfológica (Lámina 8. D, E, F, G y H), estas variaciones derivan en una diferencia en el área abdominal, pero principalmente en el tamaño y posición de los sifones.

Distribución geográfica: En el Pacífico mexicano; en Cueva Marietas, Bahía de Banderas, Nayarit, en Los Arcos, Jalisco y en Sacramento, Guerrero, en el presente estudio.

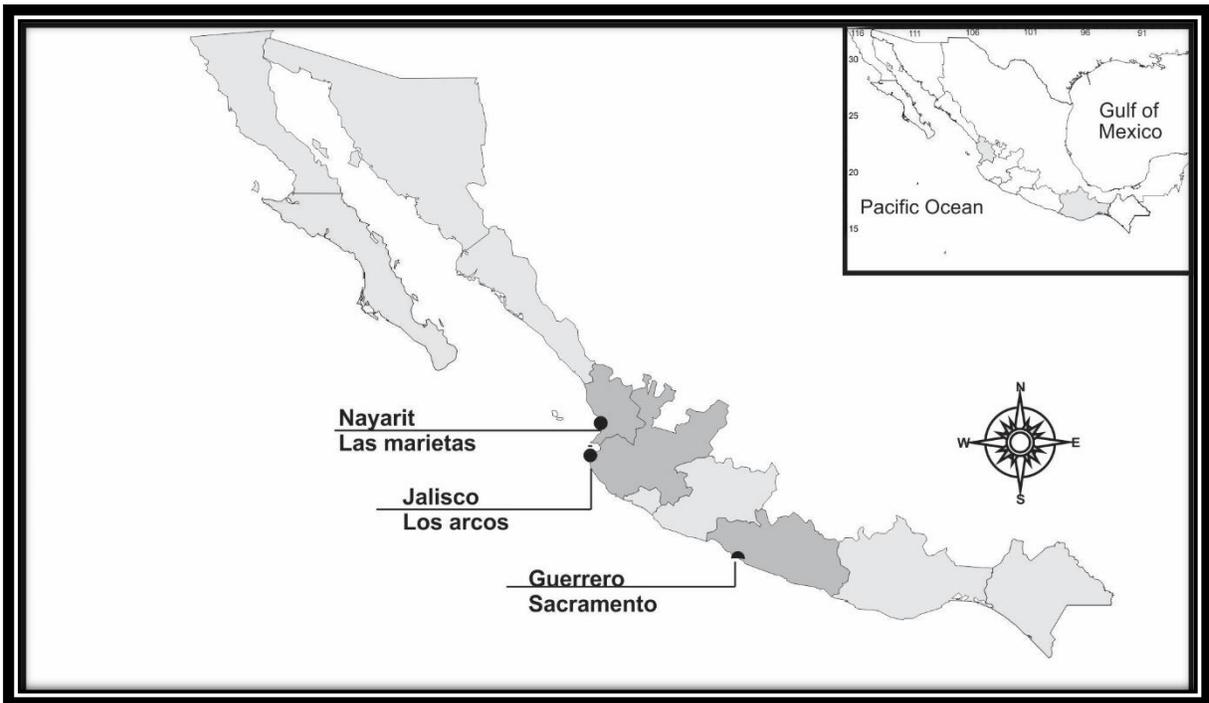


Ilustración 13. Distribución geográfica de *Eudistoma* sp.1 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

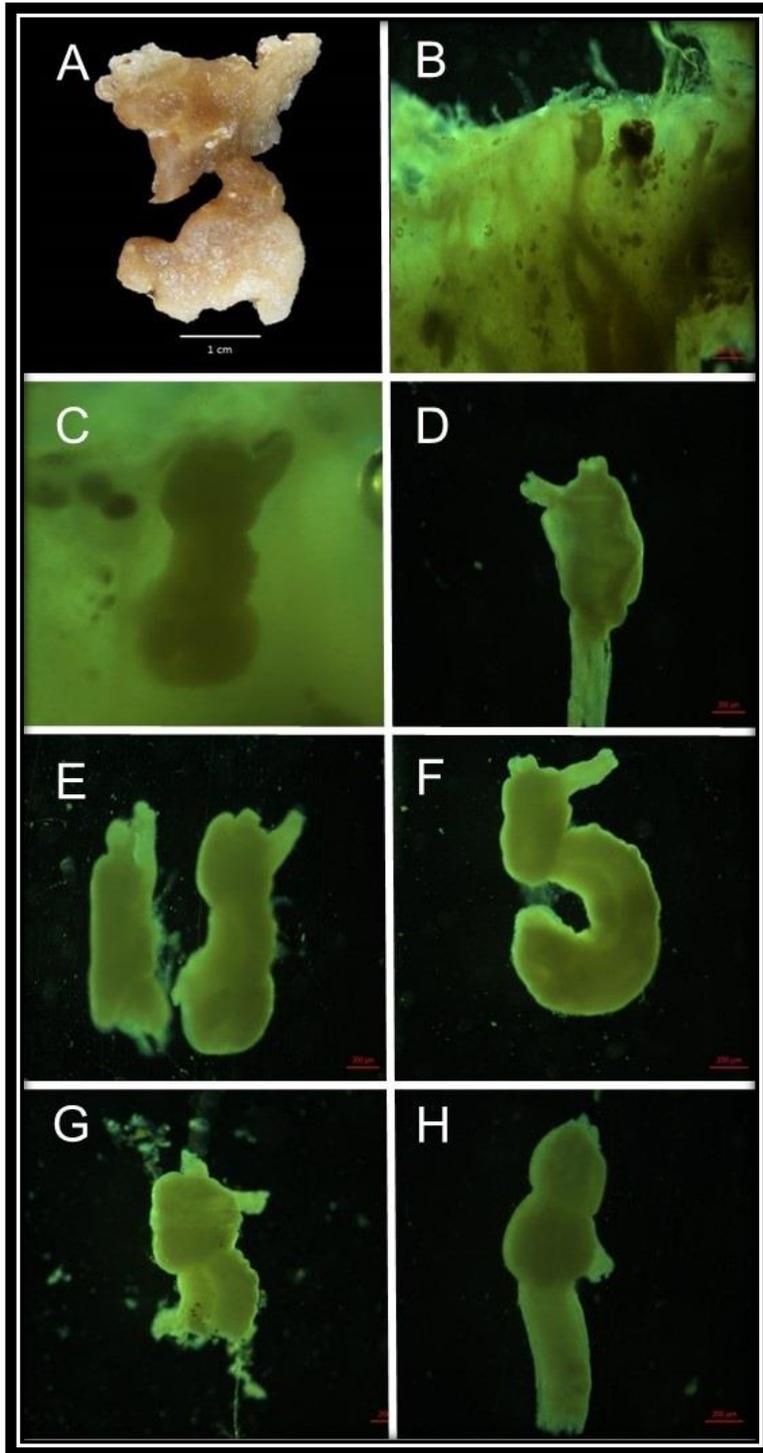


Lámina 8. *Eudistoma* sp. 1: A) Colonia; B) Zooide 1: Embebido en la túnica; C) Zooide 2: Embebido en la túnica; D) Zooide: Forma 1; E) Zooide: Forma 2; F) Zooide: Forma 3; G) Zooide: Forma 4; H) Zooide: Forma 5.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Eudistoma* sp. 2**

Lámina 9

Material examinado: LEB-23; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 08/04/2002; 6 metros. 24; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 04/10/2002; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial de 2.3 cm de diámetro y 0.8 cm de grosor, cuya forma es de almohadilla con apariencia gelatinosa y coloración superficial amarilla (Lámina 9. A) en estado de preservación. La túnica es muy dura, no posee espículas.

Los zooides se encuentran totalmente embebidos en la túnica (Lámina 9. A), no presentan un arreglo ordenado. Son pequeños, de aproximadamente 1 mm de largo y 198.128 µm de ancho. Poseen 2 divisiones corporales: tórax y abdomen. El tórax presenta 3 hileras de estigmas. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe, en algunos individuos se encontró el área abdominal enroscada o doblada hacia el tórax. El sifón oral posee 5 lóbulos triangulares. La musculatura externa del zooides no es muy visible.

Dentro de la misma colonia, los zooides presentan una alta variabilidad morfológica (Lámina 9. B, C, D, E y F).

Distribución geográfica: En el Pacífico mexicano: Bahía de Banderas, Nayarit y en Los Arcos, Puerto Vallarta, Jalisco, en el presente estudio. Comentarios taxonómicos del género (véase más adelante).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

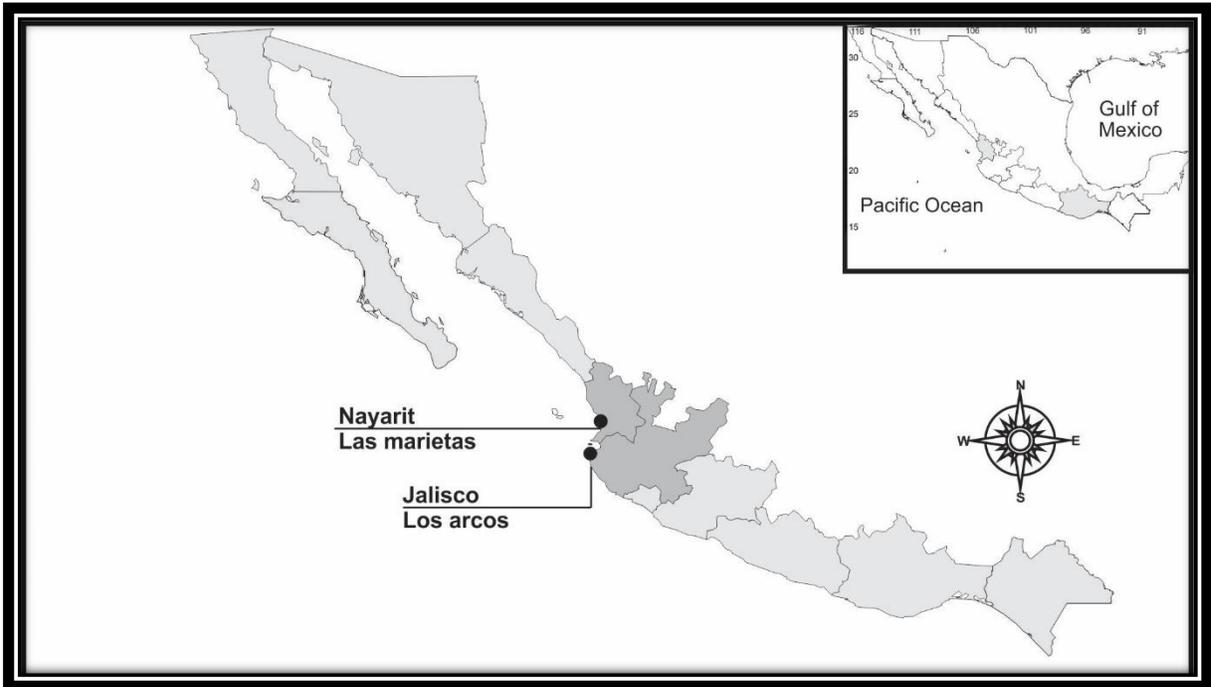


Ilustración 14. Distribución geográfica de *Eudistoma* sp.2 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

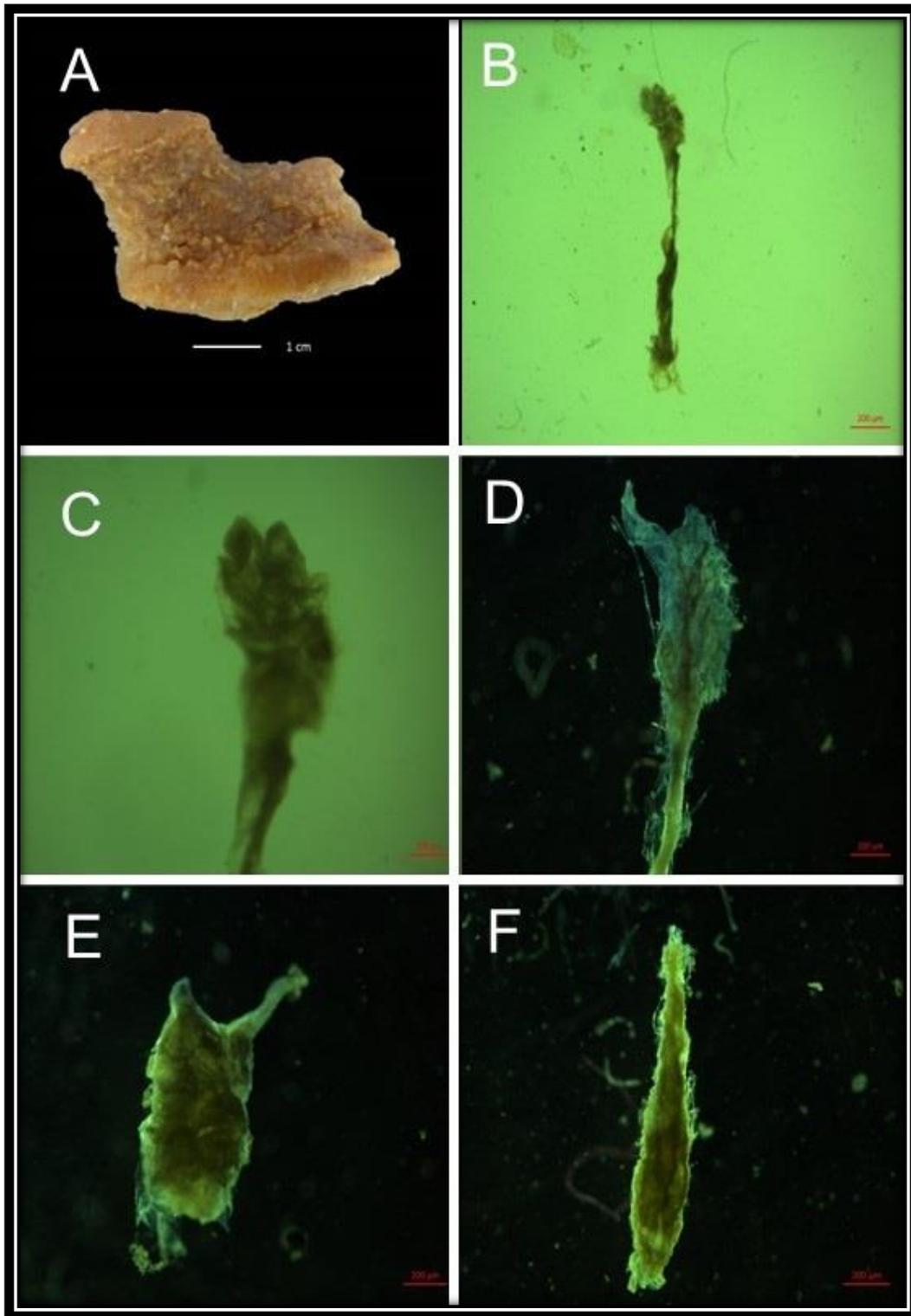


Lámina 9. *Eudistoma* sp. 2: A) Colonia; B) Zooide; C) Tórax del zooide 1; D) Zooide 2; E) Zooide 3; F) Área abdominal.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Eudistoma* sp.3**

Lámina 10.

Material examinado: LEB-25; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva las Marietas; Lat. 20°42'3.6", Long. 105°33'57.6"; 05/10/2002; Intermareal. SEM-TUN-386; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°42'3.6", Long. 105°33'57.6"; 05/10/2002; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial de 10.0 cm de largo y 1.2 cm de grosor, cuya forma es de almohadilla con apariencia gelatinosa y cubierta completamente de granos de arena, lo cual le da una coloración superficial pardo en estado de preservación (Lámina 10. A). La túnica es muy dura, no posee espículas.

Los zooides se encuentran totalmente embebidos en la túnica, no presentan un arreglo ordenado. Son relativamente grandes, de aproximadamente 2.6 mm de largo. El tórax es grande mide 1.2 mm de largo y 1.2 mm de ancho. Poseen 2 divisiones corporales: tórax y abdomen. El tórax es muy ancho, presenta 3 hileras de estigmas. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe, en algunos individuos se encontró el área abdominal enroscada o doblada hacia el tórax., mide 0.07 mm de largo y 411.58 µm de ancho. Los sífonos se encuentran distantes, mientras que el sífón oral posee 6 lóbulos triangulares y 4 en el sífón atrial. La musculatura es prominente, compuesta de bandas longitudinales externas y circulares o longitudinales internas.

Dentro de la misma colonia, los zooides presentan una alta variabilidad morfológica (Lámina 10. B, C y D).

Distribución geográfica: En el Pacífico mexicano: Cueva Marietas, Bahía de Banderas, Nayarit, en el presente estudio. Comentarios taxonómicos del género (véase más adelante).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

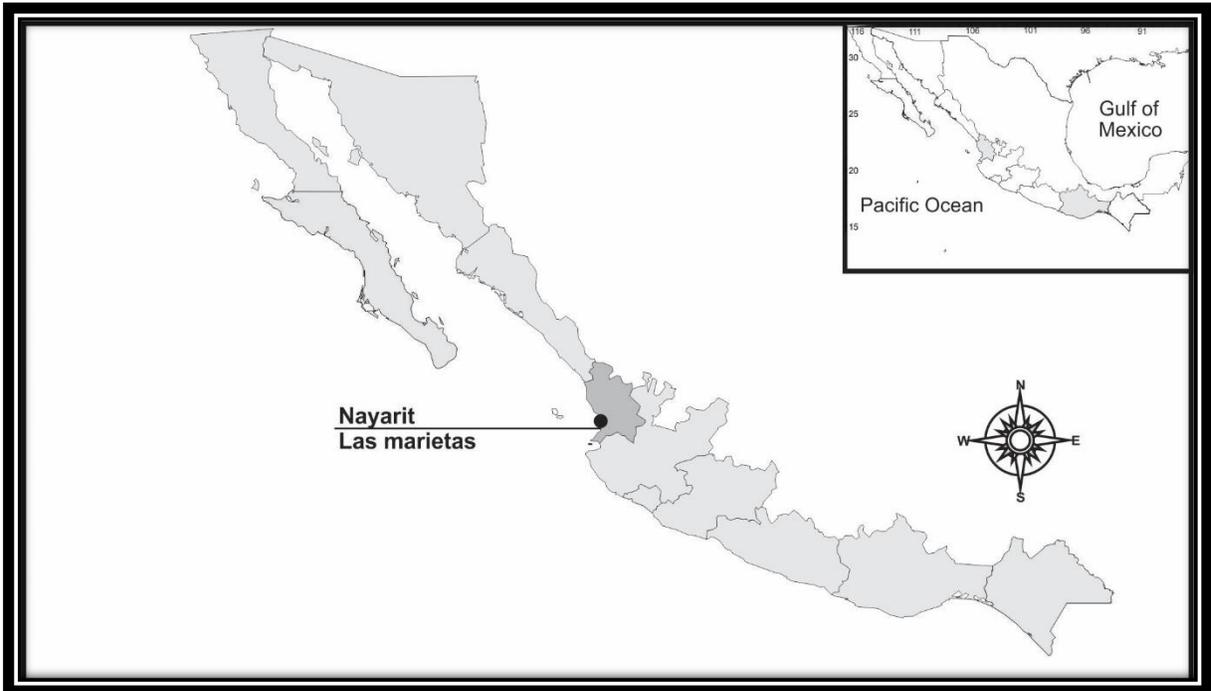


Ilustración 15. Distribución geográfica de *Eudistoma* sp. 3 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

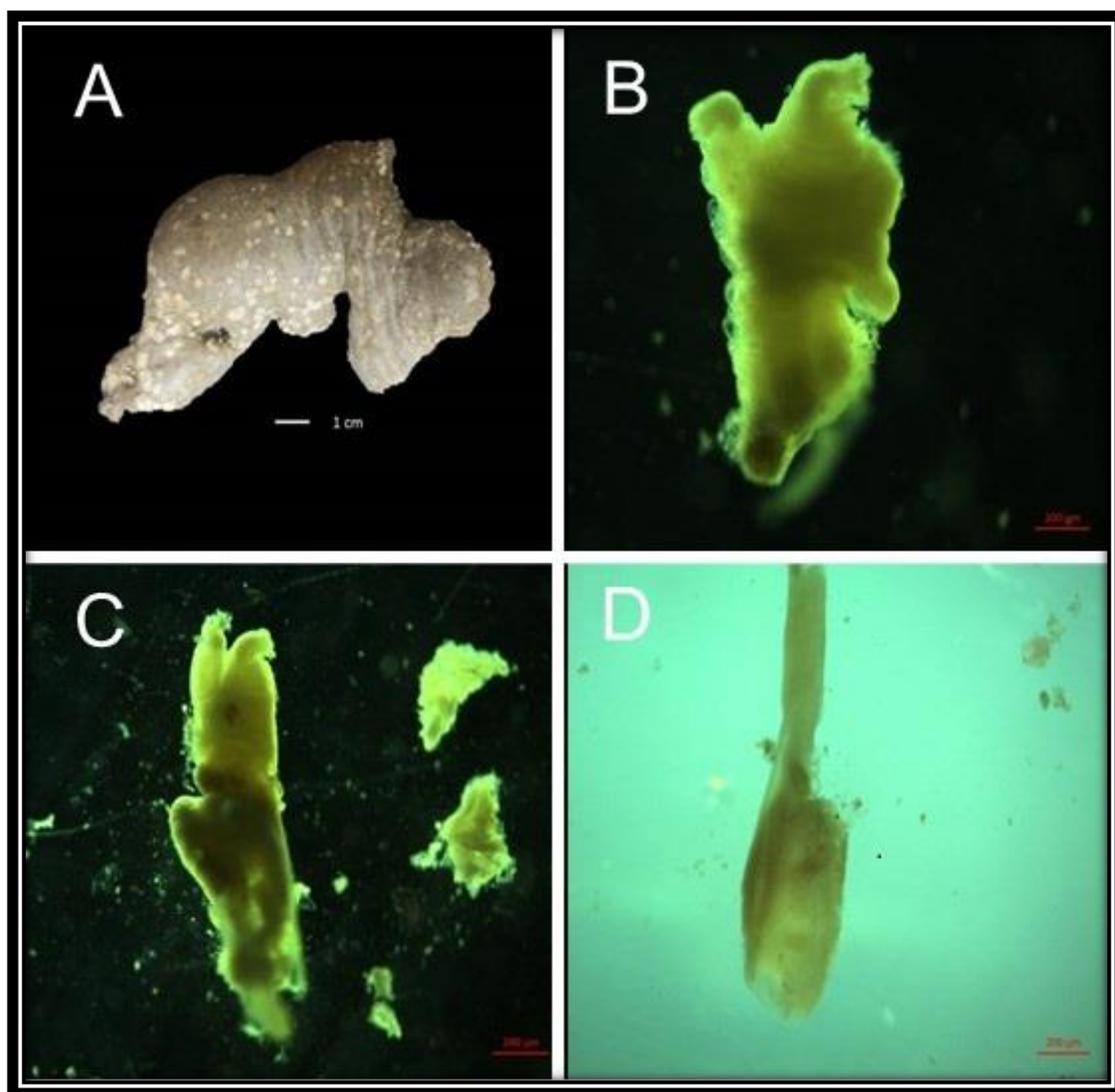


Lámina 10. *Eudistoma* sp. 3: A) Colonia; B) Zooide: Forma 1; C) Zooide: Forma 2; D) Área abdominal.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Eudistoma* sp.4**

Lámina 11.

Material examinado: SEM-TUN-260; Nayarit-Bahía de Banderas- Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 05/10/2002; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial de 10.8 cm de diámetro y 2.0 cm de grosor, cuya forma es de almohadilla con apariencia gelatinosa (Lámina 11. A), cuya coloración se torna marrón (en estado de preservación). La túnica es muy suave, no posee espículas.

Los zooides se encuentran totalmente embebidos en la túnica, no presentan un arreglo ordenado. Son pequeños, de aproximadamente 1.3 mm de largo y 0.05 mm de ancho. Poseen 2 divisiones corporales: tórax y abdomen. El tórax presenta 3 hileras de estigmas. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe con un pedúnculo ectodermal de 356.202 µm de ancho. Los sifones se encuentran en diferentes posiciones (próximos o distantes), mientras que el sifón oral posee 6 lóbulos redondeados y el sifón oral sin lóbulos. La musculatura externa no es muy prominente, compuesta de líneas circulares en los sifones y musculatura longitudinal externa en el área torácica.

Dentro de la misma colonia, los zooides presentan una alta variabilidad morfológica (Lámina 11. B, C, D, E, F, G y H).

Distribución geográfica: En el Pacífico mexicano: Cueva las Marietas, Bahía de Banderas, Nayarit, presente estudio. Comentarios taxonómicos del género (véase más adelante).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

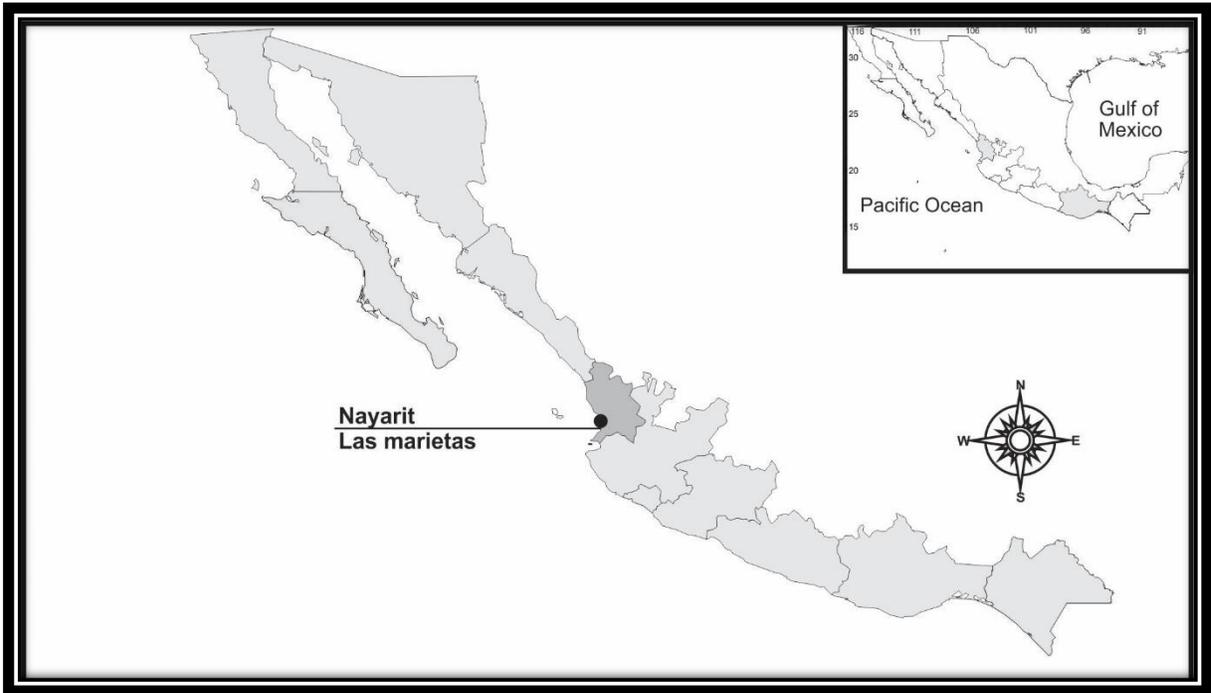


Ilustración 16. Distribución geográfica de *Eudistoma* sp.4 en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

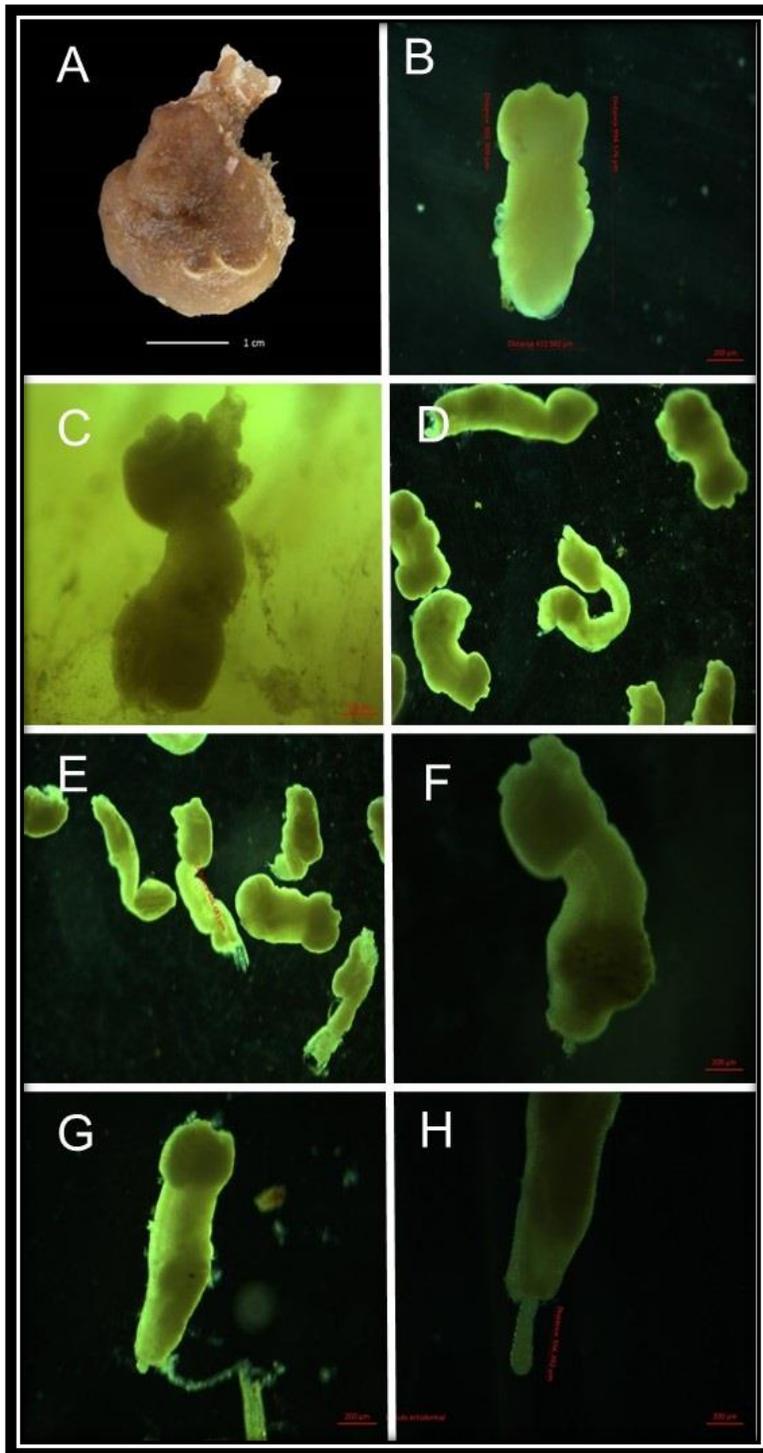


Lámina 11. *Eudistoma* sp. 4: A) Colonia; B) Zooide: Forma 1; C) Zooide: Forma 2; D) Zooide: Forma 3; E) Zooide: Forma 4; F) Zooide: Forma 5; G) Zooide: Forma 6; H) Pedúnculo ectodermal.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 5. Comparación de características entre el género *Eudistoma* sp.1, sp.2, sp.3 y sp.4.

Características	<i>Eudistoma</i> sp. 1	<i>Eudistoma</i> sp. 2	<i>Eudistoma</i> sp.3	<i>Eudistoma</i> sp. 4
Color de la colonia	Beige	Amarillo	Pardo	Marrón
Tamaño del zooide	0.9 mm	1.0 mm	2.6 mm	0.1 mm
(largo/ancho)	0.3 mm	0.1 mm	1.2 mm	0.5 mm
Sifón oral	Corto, 6 lóbulos redondeados	Corto, 5 lóbulos triangulares	Corto, 6 lóbulos triangulares	Corto, 6 lóbulos redondeados
Sifón atrial	Largo	Largo	largo	largo
Área abdominal	Redondeada	Enroscada y alargada	Alargada	Amplia
Pedúnculo ectodermal	No	No	No	Si

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Comentarios taxonómicos del género: el género *Eudistoma* es de los más diversos de la Clase, cuenta con 166 especies válidas, distribuidas principalmente en costas de los océanos Atlántico e Índico y del mar Mediterráneo. Mientras que en costas del Océano Pacífico el número de registros es muy bajo. Aunque, en el Pacífico mexicano no hay especies registradas (en artículos científicos), que pertenezcan a este género, en un reporte científico acerca de la biodiversidad de ascidias en el Pacífico mexicano fueron registradas tres especies: *Eudistoma diaphanes*, *Eudistoma molle*, *Eudistoma psammion* en costas de Sonora (Carballo, 2004).

Haciendo una revisión del material biológico, se encontró una gran variabilidad morfológica intraespecífica, derivada de la alta plasticidad fenotípica de los individuos. Este factor dificulta la correcta identificación de las especies, debido a que en las descripciones de especies conocidas solo se centran en la revisión de 1 o 2 individuos, dejando muy grande el margen de error. Para evitarlo, se tendrían que tomar en cuenta estas diferentes formas para poder especificar a qué especie pertenece. Los ejemplares fueron diferenciados entre ellos por las siguientes características: la coloración beige del zooide, su diminuto tamaño, la forma redondeada de sus lóbulos orales y de su abdomen, pero principalmente la forma general que tiene su cuerpo (Tabla 4.).

Finalmente, haciendo una combinación de las características morfológicas observadas (anatomía del zooide y la variabilidad intraespecífica que presentan) y la revisión de la literatura (principalmente de la distribución geográfica y descripciones de las especies), se sugiere que: para una confirmación de la identificación taxonómica se realicen análisis moleculares comparativos.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Género *Cystodytes* Von Drasche, 1884

***Cystodytes aff. lobatus* (Ritter, 1900)**

Lámina 12.

Sinonimias: *Distoma lobata* Ritter, 1900; *Eudistoma lobata* (Ritter, 1900); *Eudistoma lobatum* (Ritter, 1900).

Material examinado: LEB-15; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56, Long. 105°35'06"; 02/04/2002; 10 metros. 16; Nayarit-Bahía de Banderas-Isla El Morro; Lat. 21°40'22", Long. 106°40'55"; 04/10/2002; Intermareal. SEM-TUN-264 y 265; Sinaloa-Mazatlán-Isla Pájaros; Lat. 23°15'00", Long. 105°17'16"; 11/07/2014; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial de 1.5 cm de largo, 0.9 cm ancho y 0.3 cm de grosor, cuyos bordes son redondeados (Lámina 12. A). La apariencia es lisa, suave y gelatinosa. La túnica es muy delgada, translúcida y posee partículas de material orgánico (Lámina 12. B). Los zooides se encuentran completamente embebidos en la túnica y envueltos en una cápsula de pocas espículas circulares de diferentes tamaños entre 402.26 µm y 68.08 µm de diámetro, cuya forma es irregular (Lámina 12. C y D).

Los zooides son irregulares, con un tamaño aproximado de 1.2 mm de largo y 0.5 mm de ancho. El sifón oral se encuentra expuesto en la superficie de la colonia. El cuerpo se encuentra dividido en 2 regiones: tórax y abdomen, el canal alimentario se encuentra posterior a la faringe (Lámina 12. E y F). Las gónadas se encuentran en la pared intestinal.

Distribución geográfica: La especie fue identificada por primera vez en la costa de Dillon Beach (Ritter, 1900). Posteriormente fue registrada en: Long Beach, Pescadero Point Beach y Monterey Bay (Van Name, 1945). En el Pacífico mexicano: Bahía de Banderas y Cueva Marietas, Nayarit, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

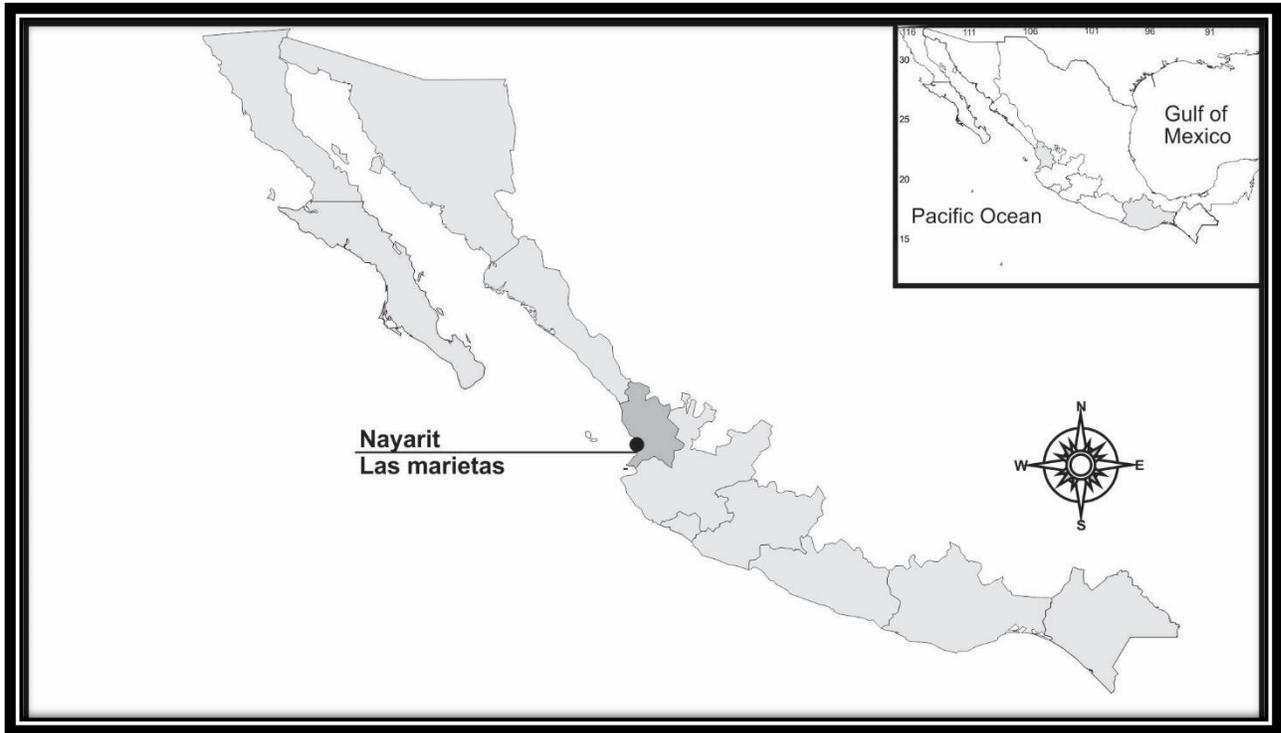


Ilustración 17. Distribución geográfica de *Cystodytes* aff. *lobatus* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: La descripción de Van Name (1945) es muy corta y ambigua, a pesar de ello, lo descrito coincide con lo observado en el ejemplar examinado. Sin embargo, no se pudieron observar más características internas para confirmar la correcta identificación de la especie. Con este estudio se registra por primera vez la especie en costas del Pacífico mexicano.

Código de Barras: Se obtuvieron 2 secuencias de 604 pb, que después ser alineadas resultaron ser idénticas entre sí. Estas secuencias son representativas de los ejemplares SEM-TUN-264 y SEM-TUN-265. Al comparar la secuencia con sus similares disponibles en Gen Bank, se observó que esta difiere en 13% a la secuencia más cercana que es un *Cystodytes dellechiaiei* (Núm. de acceso AY523044.1).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

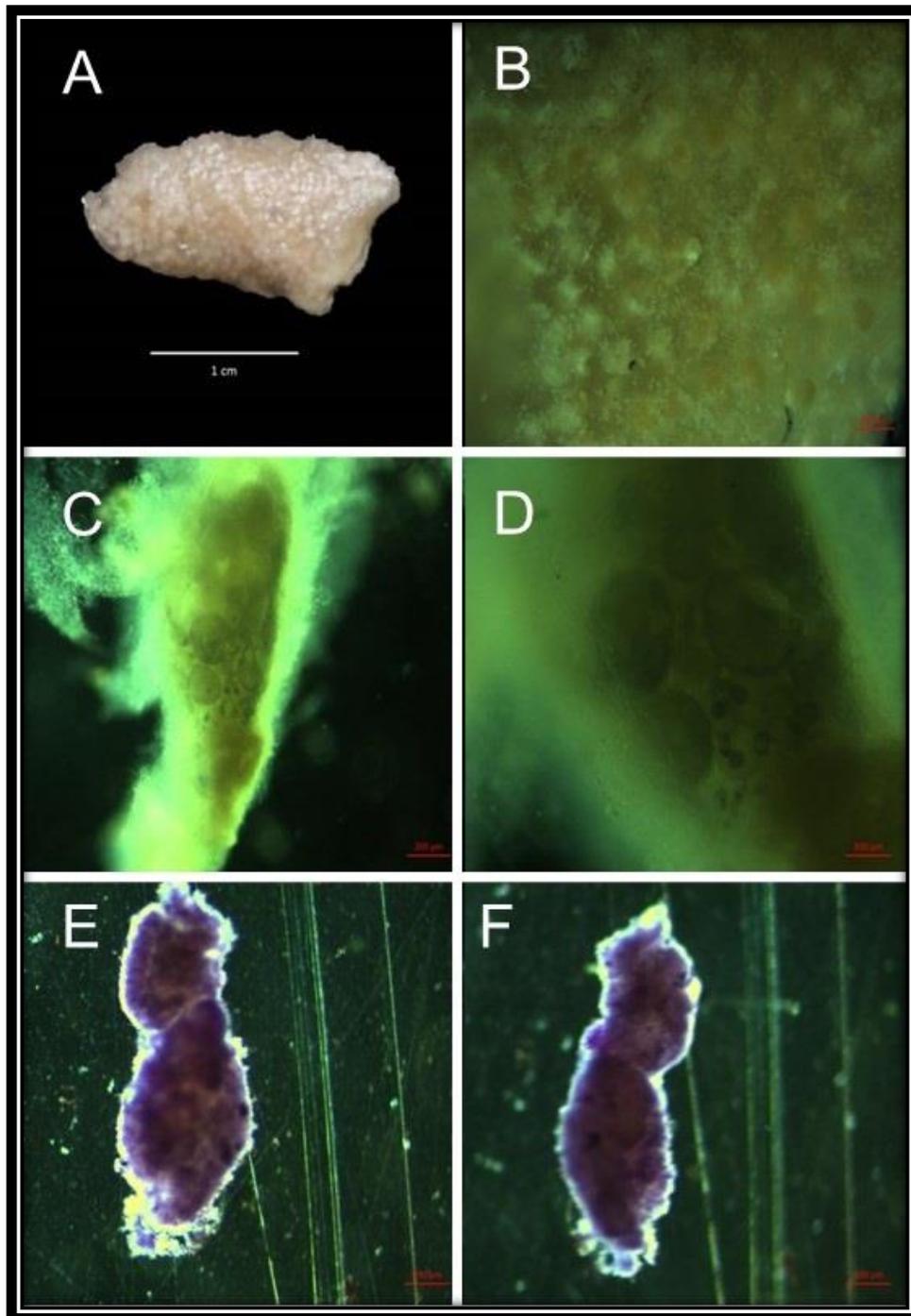


Lámina 12. *Cystodytes* aff. *lobatus* (Ritter, 1900): A) Colonia; B) Zooides embebidos en la túnica; C) Zooides envueltos en espículas; D) Espículas; E) Zooide: Lado derecho; F) Zooide: izquierdo.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Familia Polyclinidae Milne Edwards, 1841

Género *Aplidium* Savigny, 1816

***Aplidium* sp.**

Lámina 13.

Material examinado: LEB-21; Nayarit-Santiago Ixcuintla-Isla Isabel; Lat. 21° 52' 30", Long. 105° 54' 54"; 22/11/1999; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial de 2.5 cm de diámetro y 1.0 cm de grosor, la forma es de almohadilla con apariencia gelatinosa y coloración superficial blanca (preservado) (Lámina 13. A). La túnica es muy dura y transparente, no posee espículas, sin embargo, presenta gran cantidad de desecho orgánico.

Los zooides se encuentran totalmente embebidos en la túnica, no presentan un arreglo ordenado, son pequeños, de aproximadamente 1.3 mm de largo y 240.15 µm de ancho. Poseen 3 divisiones corporales: tórax, abdomen y postabdomen. El sifón oral posee 6 lóbulos triangulares y alargados. La musculatura externa no es muy visible, es confusa. El sifón oral es una pequeña lengüeta. El tórax representa la tercera parte del tamaño total del individuo, con una gran cantidad de filas de estigmas. El canal alimentario se encuentra posterior a la faringe, el estómago es globular y plegado, el postabdomen está inmediatamente pegado al abdomen. Algunos zooides presentan 4 larvas en el conducto larvario.

Dentro de la misma colonia, los zooides presentan una alta variabilidad morfológica (Lámina 13. B, C, D, E y F), estas variaciones derivan en una diferencia en el área abdominal, la cual se encontró enroscada (Lámina 13. C) o doblada hacia el tórax (Lámina 13. B).

Distribución geográfica: En el Pacífico mexicano: Isla Isabel, Nayarit, en el presente estudio.

3

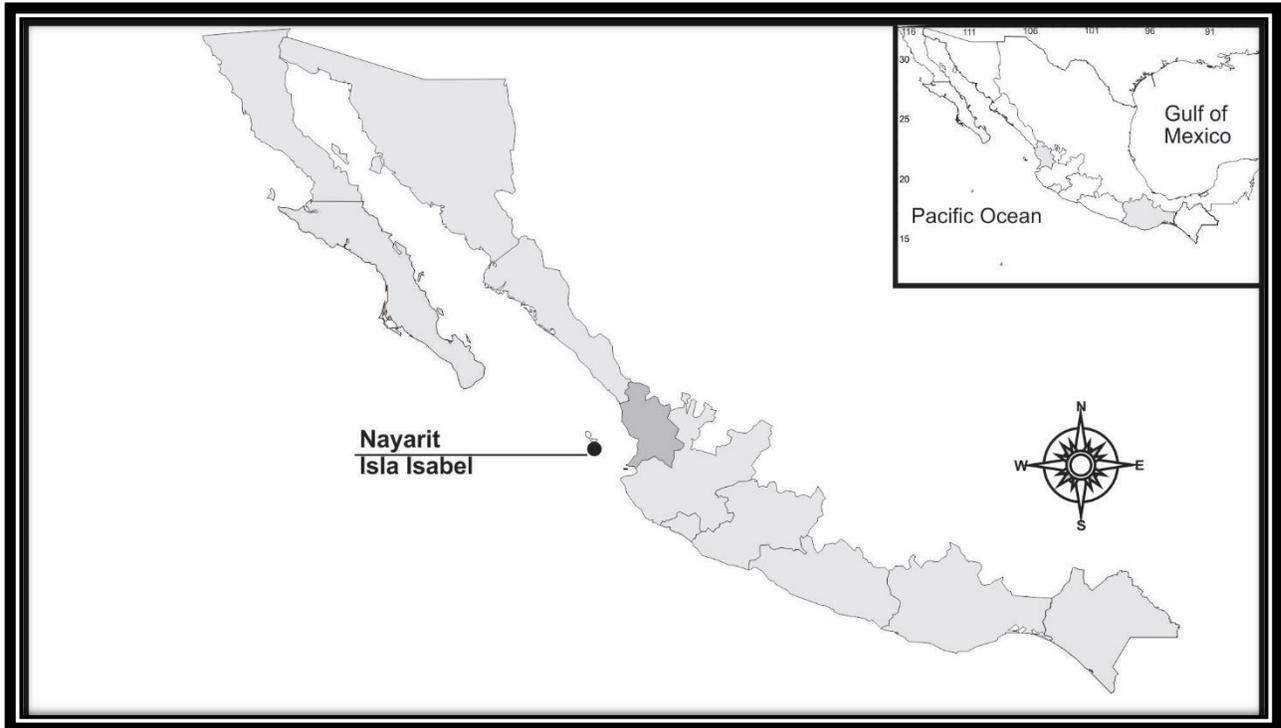


Ilustración 18. Distribución geográfica de *Aplidium* sp. en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: El tamaño de los zooides varió dependiendo el arreglo del área abdominal (doblada o enroscada). En general, los zooides presentaron una alta variabilidad intraespecífica, además de encontrarse muy contraídos imposibilitando ver su anatomía, lo cual complicó la identificación hasta el mínimo nivel taxonómico. Sin embargo, se pudo definir el género al cual pertenecía el ejemplar por la división corporal (tórax, abdomen y postabdómen), el tamaño del zooides y la gran cantidad de filas de estigmas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

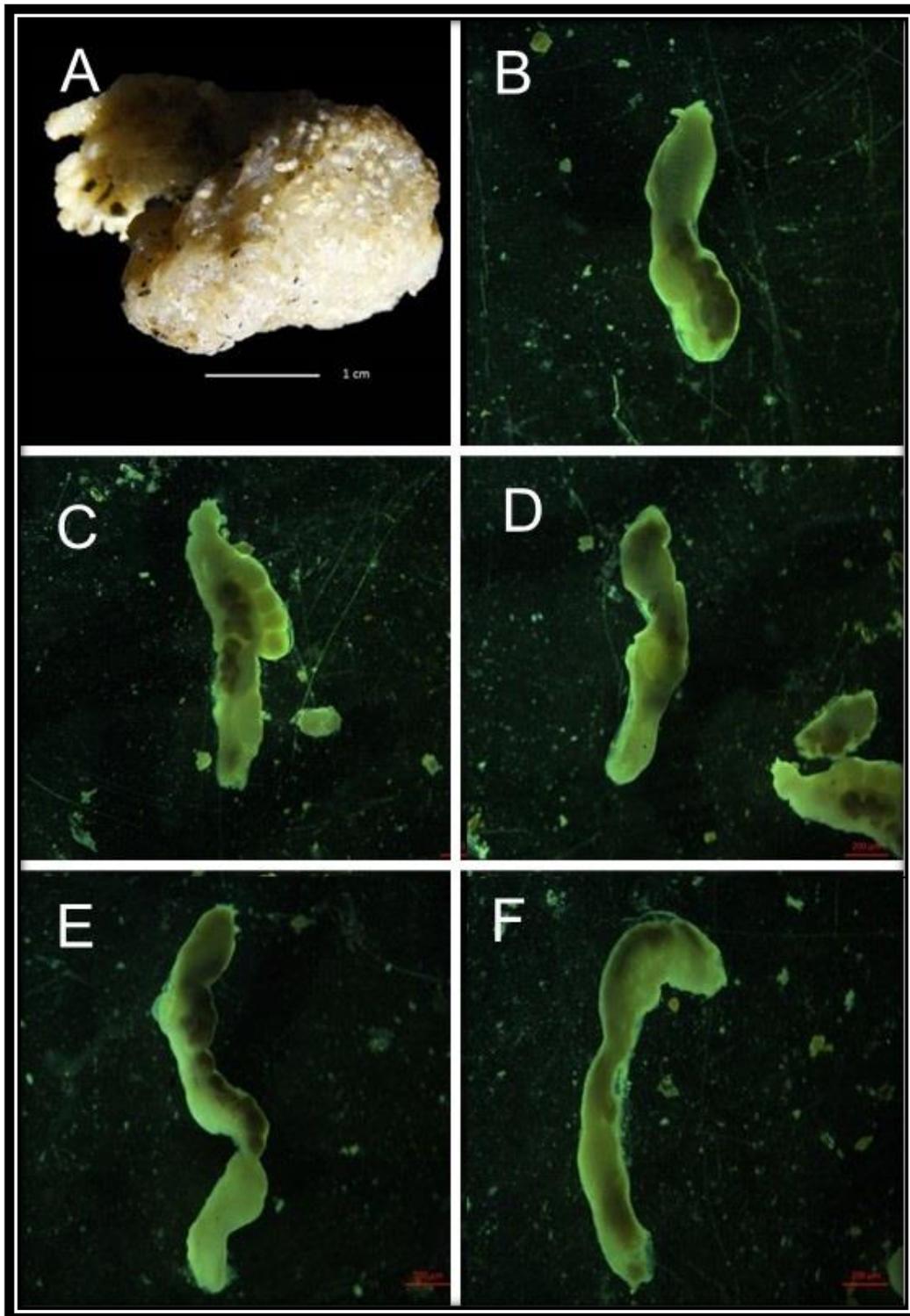


Lámina 13. *Aplidium* sp.: A) Colonia; B) Zooide: Forma 1; C) Zooide: Forma 2; D) Zooide: Forma 3; E) Zooide: Forma 4; F) Zooide: Forma 5.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Orden Phlebobranchia Lahille, 1886

Familia Ascidiidae Herdman, 1882

Género *Ascidia* Linnaeus, 1767

***Ascidia ceratodes* (Huntsman, 1912)**

Lámina 14.

Sinonimias: *Ascidia californica* Ritter y Forsyth, 1917; *Ascidia eiseni* Michaelsen, 1923; *Phallusia ceratodes* Huntsman, 1912.

Material examinado: LEB-116; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°42'3.6", Long. 105°33'57.6"; 05/10/2002; Intermareal. 111; Nayarit-Bahía de Banderas-Isla Redonda; Lat. 20°42'04", Long. 105°34'31"; 04/14/2002; Intermareal. SEM-TUN-321; Oaxaca-Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11", Long. 96°09'48"; 11/05/2016; 6-15 m. SEM-TUN-390; Guerrero-Zihuatanejo-Sacramento; Lat. 17°37'55", Long. 101°36'36"; 11/05/16; Intermareal. SEM-TUN-344; Jalisco-Puerto Vallarta-Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-405 y 406; Guerrero-Zihuatanejo-Zacatoso; Lat. 17°39'13", Long. 101°37'19"; 27/01/18; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de forma ovalada, con el cuerpo más ancho que largo, cuyas dimensiones sin túnica es de 3.5 cm de ancho y 1.4 cm de largo (Lámina 14. A), mientras que con túnica alcanza los 4.5 cm de ancho y 2.8 cm de largo (Lámina 14. B). Esta es firme y de textura cartilaginosa, presenta una coloración pálida o transparente en la parte media-central y cuya coloración aumenta en el contorno de los sifones, terminando un color amarillo o marrón (Lámina 14. A). Presenta ligeras incrustaciones de conchas en la base, sin proyecciones en la túnica y sin presencia de comensales en la faringe.

La musculatura está dispuesta en varias direcciones, pero concentradas en la base del sifón atrial. Ambos sifones presentan musculatura interna y musculatura

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

longitudinal superficial, sin ningún patrón, mientras que en la parte media-central la musculatura se vuelve compleja, presentando 3 tipos: transversal, longitudinal y oblicua. El saco branquial se encuentra en medio de la túnica.

El sifón oral se encuentra posicionado a 90° respecto de la base, mide 0.7 mm de largo. Presenta un margen de 8 lóbulos de forma triangular-alargado (Lámina 14. C), con presencia de velo y 110 tentáculos orales rectos de aproximadamente 0.08 μm cada uno (Lámina 14. D). Mientras que el sifón atrial mide 1.2 mm de largo, se encuentra arriba de la mitad, en posición de 45° respecto al sifón oral, cuya margen es lobada, con 6 lóbulos en forma triangular (Lámina 14. E).

En la pared del cuerpo se encuentra el área pre-faringea con proyecciones a lo largo de su margen, un peritubercular en forma de “V”, con un tubérculo dorsal en forma de herradura con las orillas enroscadas hacia adentro, mide 0.05 μm de largo y 0.04 mm de ancho (Lámina 14. F), este tiene una proyección que se dirige hacia el ganglio. El ganglio neuronal se encuentra entre el sifón oral y sifón atrial (Lámina 14. G).

La faringe no presenta pliegues ni vasos parastigmáticos, posee 45 vasos longitudinales de lado derecho y 42 de lado izquierdo, ambos completos, se encontraron de 3 a 6 estigmas (Lámina 14. H) entre cada vaso longitudinal y presencia de papilas entre sus intersecciones, con proyecciones en la base (Lámina 14. I). La lámina dorsal es continua, ligeramente dentada (Lámina 14. J).

El esófago es corto y se encuentra ligeramente anterior a la lámina dorsal. El estómago es ovalado, con pliegues en la pared. El intestino se ubica al lado izquierdo de la faringe. El ano carece de lóbulos (Lámina 14. K). Las gónadas se encuentran parcialmente dentro del asa intestinal, cuya forma es ramificada (Lámina 14. L).

Distribución geográfica: La especie fue descrita originalmente para la costa de Canadá (Huntsman, 1912). Posteriormente se registró desde California, USA (Bahía de Tomales, San Clemente y San Diego) hasta el Golfo de California (Puerto Refugio, Baja California) (Huntsman, 1912; Ritter y Forsyth, 19147). En Centro América (Puerto Santa Elena,

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Ecuador) y en Sudamérica (Tocopilla, Chile) (Van Name, 1945). En el Pacífico mexicano: previamente fue registrado por Moreno-Dávila (2010) en la Costa de Oaxaca, Bahía de la Paz, en el presente estudio se confirmó su presencia nuevamente en Huatulco, Oaxaca y se extendió el registro hacia Bahía de Banderas, Nayarit, en Mismaloya, Jalisco.

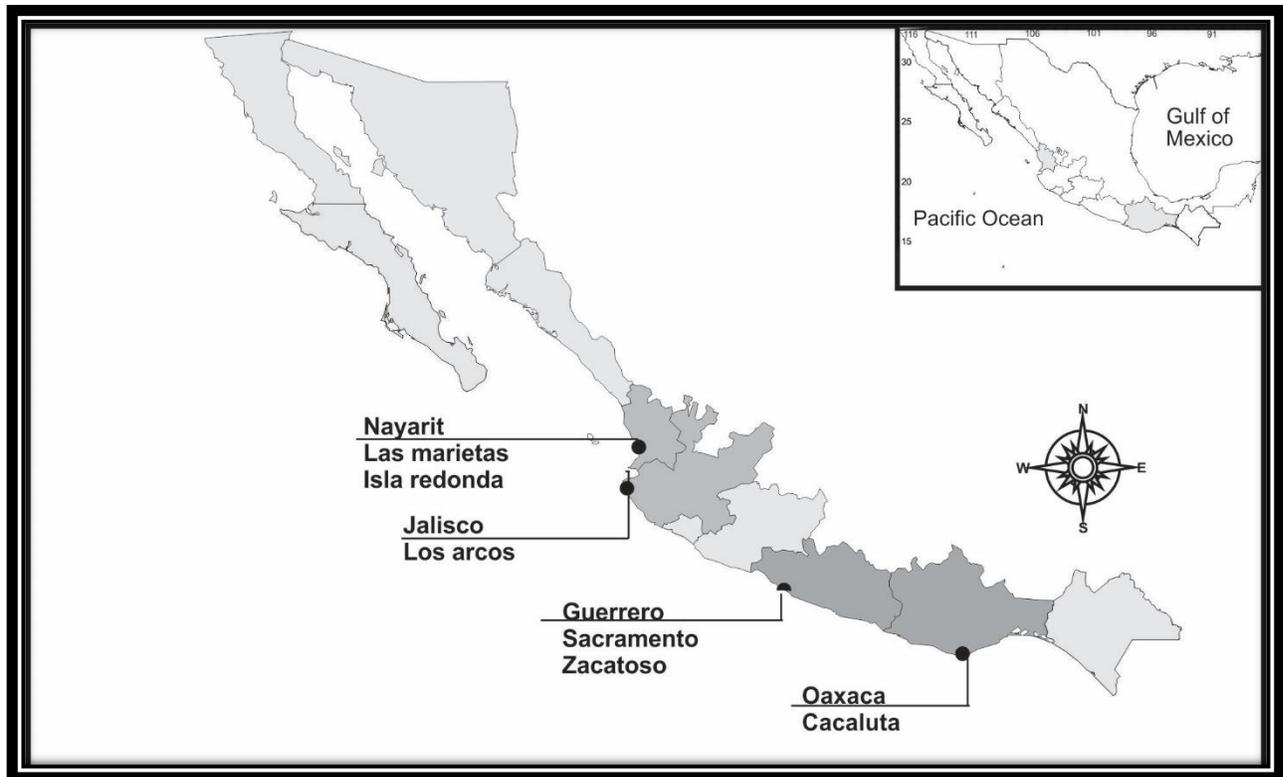


Ilustración 19. Distribución geográfica de *Ascidia ceratodes* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios morfológicos: La identificación de *Ascidia ceratodes* (Huntsman, 1912) suele ser un poco confusa, ya que como lo menciona Van Name (1945) se puede confundir con *Ascidia californica* Ritter y Forsyth, 1917 y *Ascidia interrupta* Heller, 1878. Sin embargo, *Ascidia ceratodes* Hutsman, 1912 se diferencia de ellas por la forma de su cuerpo (más ancha que alargada) y por la posición de sus órganos internos. Basándose en esas características se pudo identificar el ejemplar. Aunque esta especie ya había sido registrada en la costa de Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010) en este estudio se registra

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

por primera vez en costas de Nayarit y Jalisco, con lo cual se amplía su registro en el Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

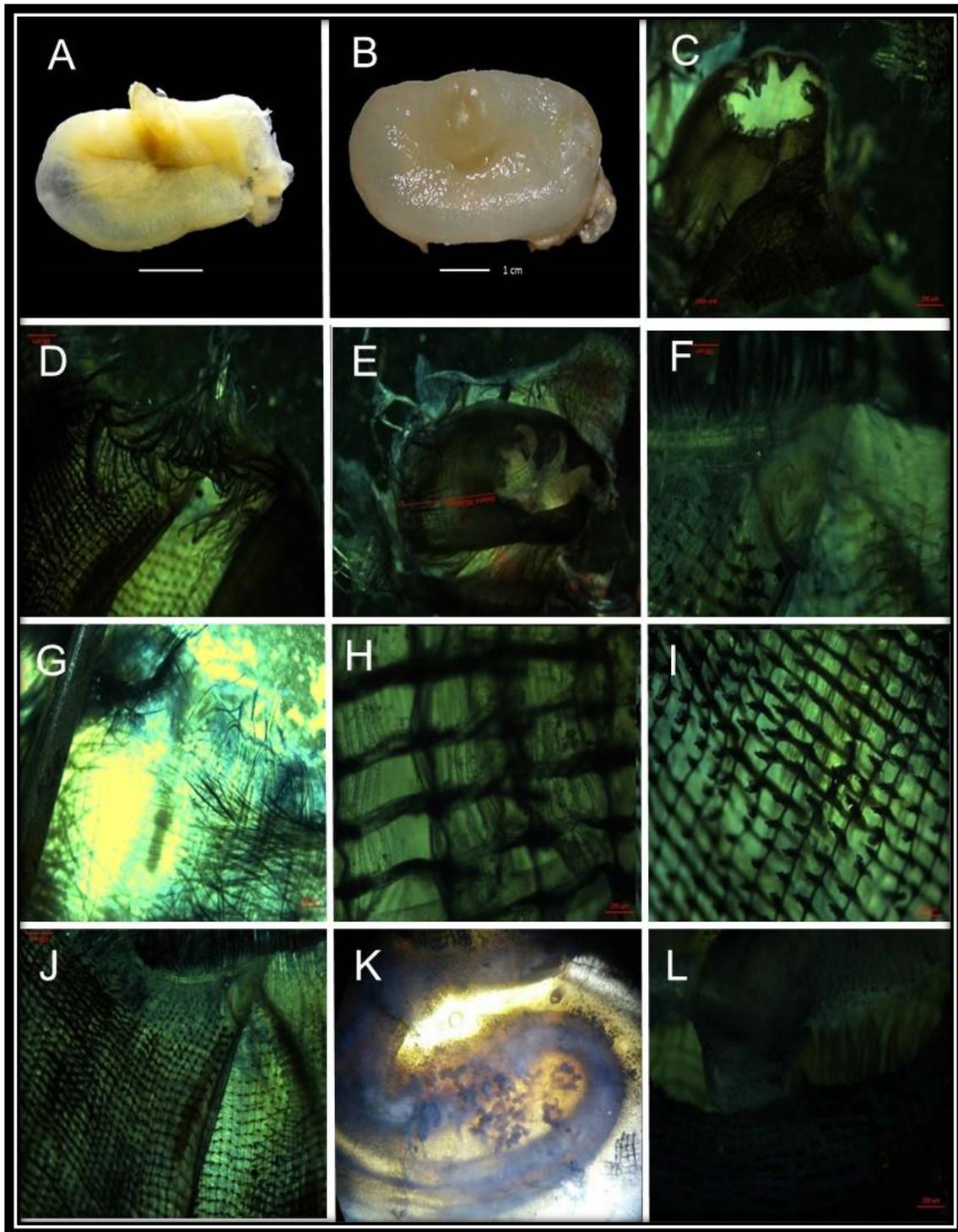


Lámina 14. *Ascidia ceratodes* (Huntsman, 1912): A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica; C) Lóbulos orales; D) Tentáculos orales; E) Lóbulos atriales; F) Tubérculo dorsal; G) Ganglio neuronal; H) Estigmas; I) Papilas proyectadas en los vasos longitudinales; J) Lámina dorsal; K) Gónadas; L) Ano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Ascidia liberata* Sluiter, 1887**

Lámina 15.

Sinonimias: *Ascidia dorsalis* Monniot, 1987, *Ascidia solomonensis* Nishikawa, 1986.

Material examinado: LEB-122; Nayarit-Bahía de Banderas-Tecuchitán; Lat. 20°43'55.2", Long. 105°24' 43.2"; 05/10/2002; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de forma ovalada y un ancho uniforme sus dimensiones sin túnica son de 0.8 cm de ancho y 2.0 cm de largo (Lámina 15. A), mientras que con túnica alcanza los 1.3 cm de ancho y 2.5 cm de largo (Lámina 15. B). La túnica es de textura dura, firme y cartilaginosa, presenta una coloración pálida o translúcida uniforme con algunos pliegues o arrugas en su superficie. Los sifones presentan proyecciones cónicas. Presenta incrustaciones de conchas. El manto del cuerpo es de color ligeramente parduzco.

La musculatura es más pronunciada del lado derecho del individuo, no es compleja, ambos sifones presentan musculatura circular conspicua interna y musculatura longitudinal superficial, los cuales forman bandas en cada lóbulo. Mientras que la base de estos está formada por fibras cortas longitudinales muy marcadas de 118.416 μm de grosor (Lámina 15. C), estas líneas se pierden al llegar a los órganos internos, dejándolos al descubierto. Por lo tanto, el área abdominal se encuentra cubierta por la faringe, libre de musculatura.

El sifón oral y el sifón atrial se encuentran posicionados de manera horizontal, formando un ángulo cercano a los 90° con respecto de la base (Lámina 15. E). El sifón oral mide 1.6 mm de longitud, presenta un margen de 7 lóbulos de forma triangular (Lámina 15. F) y aproximadamente 200 tentáculos orales rectos de aproximadamente 0.08 μm cada uno (Lámina 15. G). Mientras que el sifón atrial mide 1.5 mm de longitud, con 6 lóbulos en forma triangular (Lámina 15. H). En ambos sifones no se encontraron manchas de pigmentos.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

En la pared del cuerpo se encuentra el área peritubercular en forma de “V”, con un tubérculo dorsal en forma de “U”, con los extremos muy enrolladas hacia el centro, lo cual da una apariencia en forma de corazón con un tamaño de 258.81 μm de largo y 153.94 μm de ancho (Lámina 15. I), este tiene una proyección que se dirige hacia el ganglio (Lámina 15. J), el cual se encuentra entre ambos sifones, pero más cerca del sifón oral.

La faringe no presenta pliegues ni vasos parastigmáticos, posee 38 vasos longitudinales completos de lado derecho, con entre 4 y 5 estigmas entre cada vaso longitudinal y presencia de papilas entre sus intersecciones (Lámina 15. J), con proyecciones en la base. La lámina dorsal es doble y continua, con ligeras proyecciones formadas por los vasos transversales, lo que hace que se confunda con lengüetas, presenta 12 dobleces y abarca la tercera parte de la distancia entre el sifón oral y el atrial, ésta mide 908.85 μm de longitud.

El estómago es grande y ovalado (Lámina 15. K). El intestino se ubica al lado izquierdo de la faringe. Las gónadas se encuentran parcialmente fuera del asa intestinal, cuya forma es saculiforme (Lámina 15. L). Los ovocitos miden 0.04 mm de diámetro.

Distribución geográfica: La especie fue registrada por primera vez en Bahía de Batavia, California (Sluiter, 1887). Posteriormente fue registrada en: la costa del Pacífico oriental: Bahía de Batavia, California, en Panamá (Bonnet *et al.*, 2013) y Bahía de Banderas, Nayarit, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

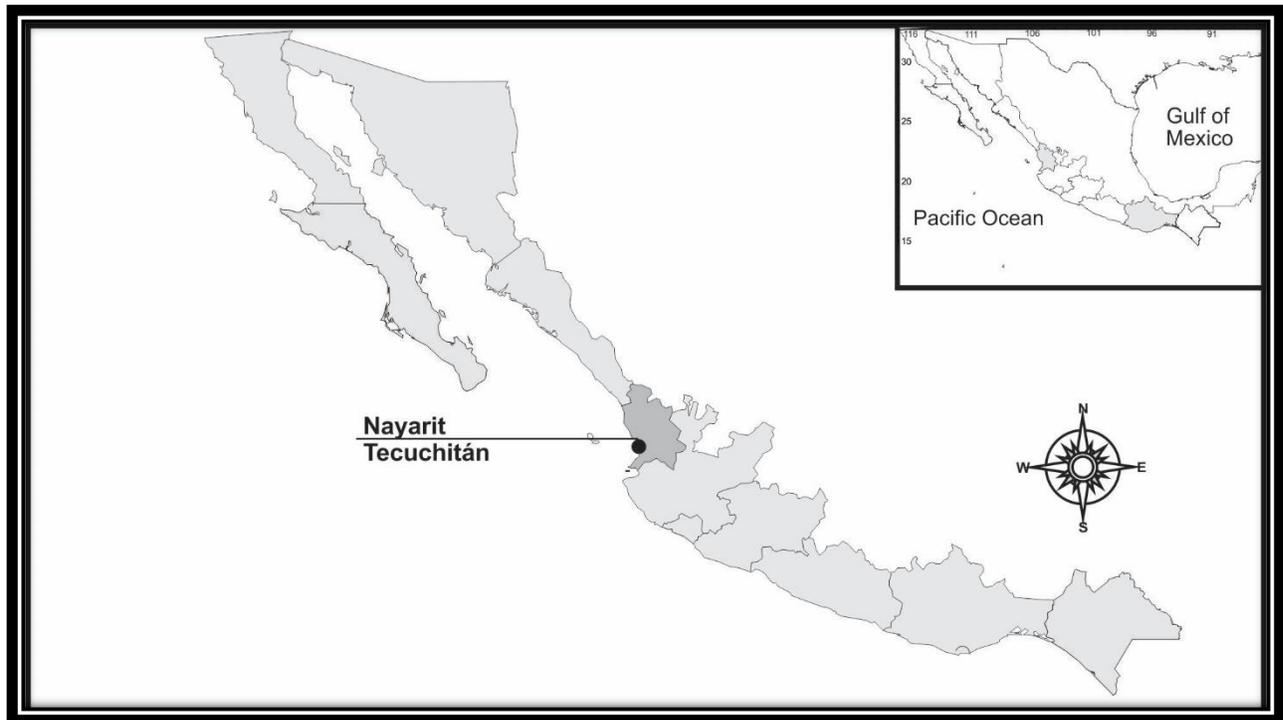


Ilustración 20. Distribución geográfica de *Ascidia liberata* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: El individuo analizado coincide con la descripción de *Ascidia liberata* realizada por Bonnet *et al* (2013). Sin embargo, algunas características no pudieron ser debidamente observadas, como el lado izquierdo de la faringe, tampoco más rasgos del área abdominal. Con este estudio se obtiene el primero registro de la especie para costas del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

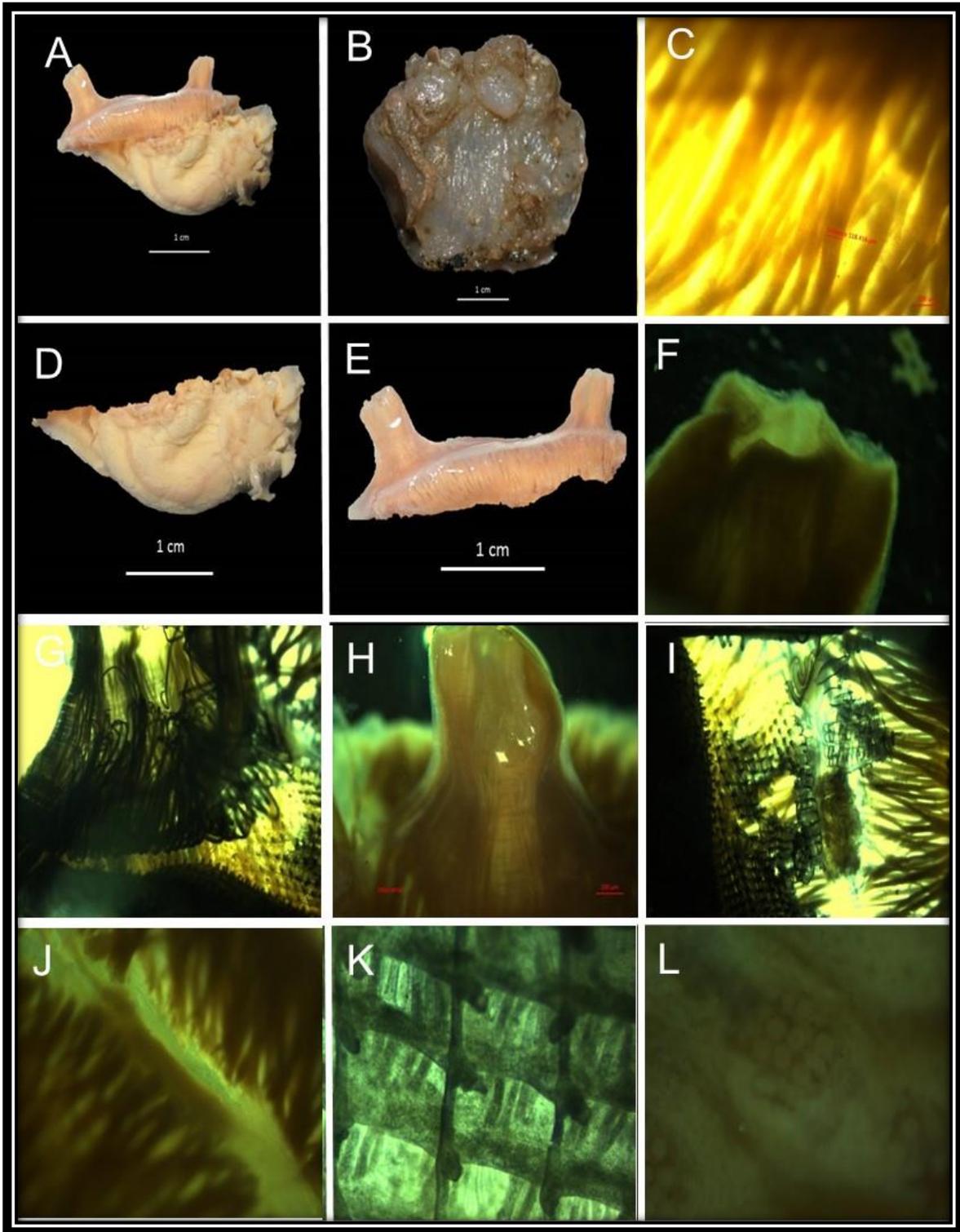


Lámina 15. *Ascidia liberata* Sluiter, 1887: A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica; C) Fibras musculares; D) Estómago; E) Musculatura externa; F) Lóbulos orales; G) Tentáculos orales; H) Sifón atrial; I) Tubérculo dorsal; J) Ganglio neuronal; K) Estigmas; L) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Ascidia sideralis* Bonnet y Rocha, 2013**

Lámina 16.

Sinonimias: *Ascidia sideralis* Bonnet y Rocha, 2013.

Material examinado: SEM-TUN-346; Jalisco-Puerto Vallarta-Los arcos; Lat. 20°32'41", Long. 105°17'28"; 22/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-416; Guerrero-Zihuatanejo-El Morro de Potosí; Lat. 17°32'03", Long. 101°30'05"; 28/01/2018; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario, con forma redondeada, cuyas dimensiones con túnica alcanzan los 3.7 cm de largo y 5.4 cm de ancho. La apariencia externa de la túnica es opaca, dura y cartilaginosa (Lámina 16. A).

El organismo sin túnica presenta una coloración amarillo claro. La musculatura es compleja, está conformada por densas y numerosas bandas circulares y pocas líneas longitudinales en ambos sifones, mientras que, en la región central, dichas bandas se vuelven más complejas, las cuales van en varias direcciones: oblicuas, longitudinales, transversales, formando una especie de “malla” (Lámina 16. B y C).

Los sifones son muy anchos y cortos, ambos poseen 8 lóbulos en forma triangular con manchas de pigmentos entre ellos (Lámina 16. D y E). Sin túnica: el sifón oral es más ancho que el atrial, el primero presenta un tamaño de 2.0 cm de longitud y 1.1 cm de ancho, mientras que el segundo (atrial) mide 1.0 cm de largo y 0.9 cm de ancho.

El organismo disectado (Lámina 16. F y G) posee en el área torácica aproximadamente 10 tentáculos orales lisos (Lámina 15. H), los cuales se encuentran muy dispersos entre sí. Además de presentar un área peritubercular en forma de “V” y un tubérculo dorsal amorfo (Lámina 16. I), cuyos bordes se doblan el centro. La lámina dorsal es continua (Lámina 16. J). Mientras que la región faríngea es lisa, no posee

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

pliegues y se encuentra constituida por aproximadamente 50 vasos longitudinales de lado derecho y aproximadamente 45 de lado izquierdo, con 4 hileras de estigmas y papilas proyectadas entre ellos (Lámina 16. K). El intestino es muy amplio (Lámina 16. L).

Distribución geográfica: En el Pacífico: en islas Canales, Panamá. En el presente estudio: en Mismaloya, Jalisco y Zihuatanejo.



Ilustración 21. Distribución geográfica de *Ascidia sideralis* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: La principal característica que distingue a esta especie con respecto a otras de su mismo género es la presencia de puntos en la túnica, además de coincidir con otros atributos: la forma y el número de lóbulos (orales y atriales), la musculatura externa, la forma del tubérculo dorsal, entre otras características observadas (Bonnet y Rocha, 2013). Con este estudio se obtiene el primer registro de la especie para costas del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

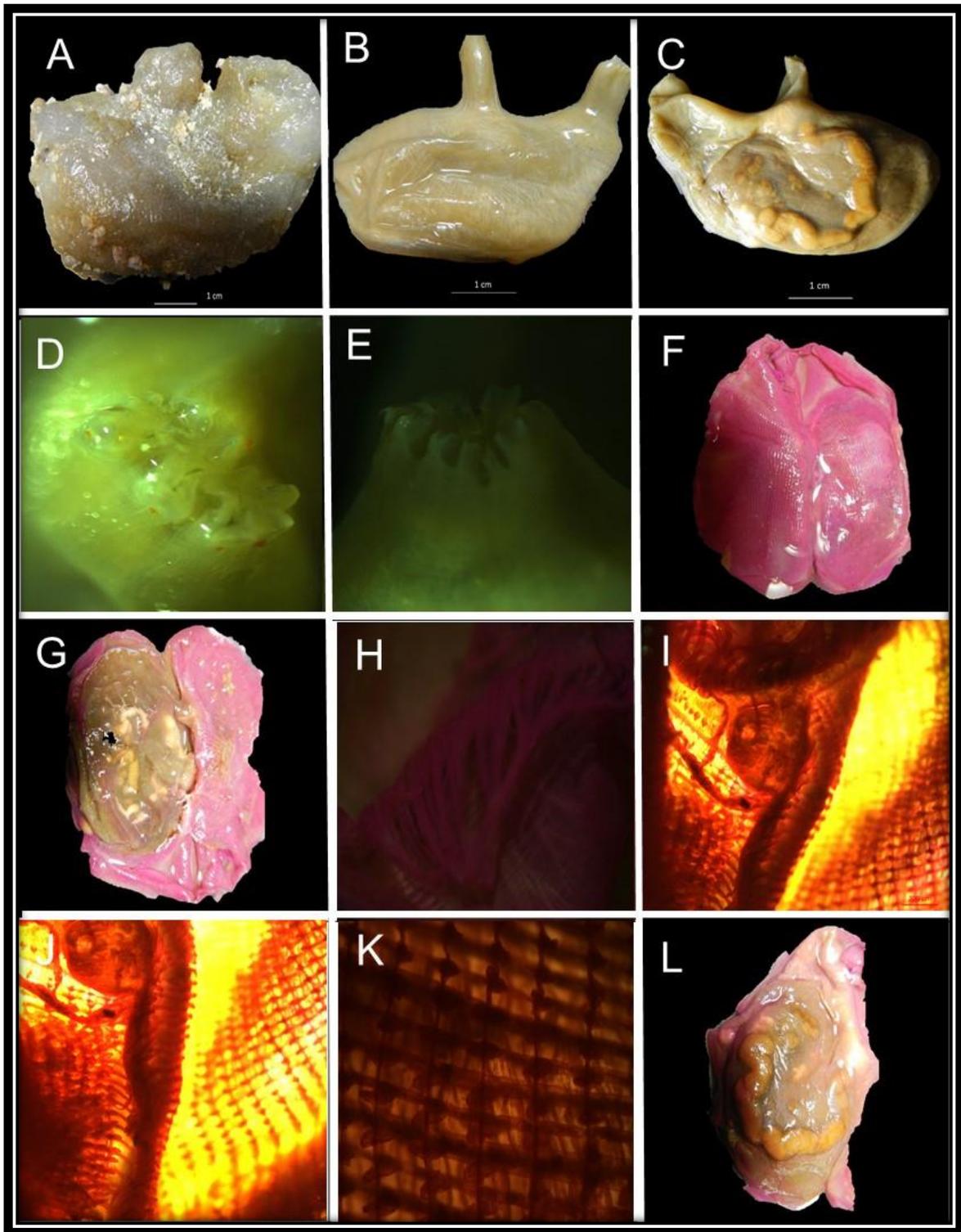


Lámina 16. *Ascidia sideralis* Bonnet y Rocha, 2013: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica: derecha; C) Individuo sin túnica: izquierda; D) Puntos de pigmento en los lóbulos; E) Lóbulos; F) Individuo disectado; G) lado derecho; H) Tentáculos orales; I) Tubérculo dorsal; J) Lámina dorsal; K) Papilas proyectadas; L) Intestino.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Ascidia cf. sydneyensis* Stimpson, 1855**

Lámina 17.

Sinonimias: *Ascidia bisulca* Sluiter, 1904, *Ascidia compta* Sluiter 1887, *Ascidia diplozoon* Sluiter, 1887, *Ascidia divisa* Sluiter, 1898, *Ascidia donnani* Herdman, 1906, *Ascidia incerta* Herdman, 1899, *Ascidia incerta* Herdman, 1898, *Ascidia limosa* Sluiter, 1887, *Ascidia longitubis* (Traustedt, 1882), *Ascidia longitudinalis* Seeliger, 1901, *Ascidia pyriformis* Herdman, 1880, *Ascidia sydneyensis* Stimpson, 1855, *Phallusia canaliculata* (Heller, 1878), *Phallusia divisa* (Sluiter, 1898), *Phallusia incerta* (Herdman, 1899), *Phallusia longitubis* Traustedt, 1882, *Phallusia pyriformis* (Herdman, 1880), *Phallusia sydneyensis* (Stimpson, 1855).

Material examinado: LEB-119; Nayarit-Bahía de Banderas-Tecuchitán; Lat. 20°43'55"; Long. 105°24'43"; 05/10/2002; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de forma de campana, el cuerpo es ligeramente alargado y más ancho de la parte inferior que superior (Lámina 17. A), cuyas dimensiones sin túnica es de 3.2 cm de ancho y 1.8 cm de largo (Lámina 17. B), mientras que con túnica alcanza los 4.0 cm de ancho y 3.0 cm de largo. La túnica es flexible y de textura cartilaginosa, presenta una coloración pálida o transparente uniforme.

La musculatura es más pronunciada del lado derecho del individuo, está dispuesta en varias direcciones, concentrándose en la base del sifón atrial, presentando 3 tipos: transversal, longitudinal y oblicua (Lámina 17. C). Ambos sifones presentan musculatura circular interna y musculatura longitudinal superficial (Lámina 17. D), formando bandas longitudinales en cada lóbulo.

El sifón oral se encuentra posicionado a 90° respecto de la base, mide 0.9 mm de largo. Presenta un margen de 8 lóbulos de forma triangular, con presencia de velo y aproximadamente 80 tentáculos orales rectos (Lámina 17. E). Mientras que el sifón atrial se encuentra posicionado a 270° respecto a la base y mide 1.0 mm de largo, con 6 lóbulos en forma triangular (Lámina 17. F). Ambos sifones presentan manchas de

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

pigmentos de color amarillo en forma de punto, en cuanto al sifón oral estos se encontraron entre cada uno de ellos y en el sifón atrial ubicados en la punta de cada lóbulo (Lámina 17. G).

En la pared del cuerpo no presenta proyecciones a lo largo del margen de la ranura per-faríngea, ni papilas, además posee un área peritubercular en forma de “V”, con un tubérculo dorsal en forma de ovalo con un tamaño de 323.86 μm de largo y 458.53 μm de ancho (Lámina 17. H), este tiene una proyección que se dirige hacia el ganglio (Lámina 15. I), el cual se encuentra entre el sifón oral y el sifón atrial.

La faringe no presenta pliegues ni vasos parastigmáticos, posee 35 vasos longitudinales de lado derecho y 30 de lado izquierdo, ambos completos, se encontraron 3 estigmas entre cada vaso longitudinal y presencia de papilas entre sus intersecciones (Lámina 17. J). La lámina dorsal es continua, ligeramente dentada (Lámina 17. J).

El esófago es corto y se encuentra ligeramente anterior a la lámina dorsal. El estómago es ovalado de un tamaño de 1.3 mm de largo. El intestino se ubica al lado izquierdo de la faringe. El ano es multilobado. Las gónadas se encuentran parcialmente fuera del asa intestinal, cuya forma es ramificada. Los ovocitos miden aproximadamente 48.43 μm de diámetro (Lámina 16. L).

Distribución geográfica: La especie fue registrada por primera vez en costas Orientales: Japón (Stimpson, 1855). Posteriormente se registró en el Atlántico: St. Thomas, Vieques, Puerto Rico, Cuba y Santa Marta, Colombia (Van Name, 1995). En el Pacífico occidental: Australia, Isla Palau, Filipinas (Monniot y Monniot, 2001), en el Pacífico mexicano: Puerto Ángel, Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010), Bahía de Banderas, Nayarit, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”



Ilustración 22. Distribución geográfica de *Ascidia* cf. *sydneiensis* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: El ejemplar analizado coincide con la descripción de Van Name (1945). Sin embargo, también difiere en algunas características como la forma del tubérculo dorsal, el autor la describe en forma de corazón, mientras que en el presente estudio es en forma de U, otra diferencia es la posición del ganglio la cual la ubica un poco detrás del tubérculo dorsal, mientras que en el ejemplar analizado este se encuentra un poco más alejado del tubérculo dorsal. Se sugiere la revisión de más ejemplares o la realización de un análisis genético para corroborar si es derivado de una variabilidad fenotípica.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

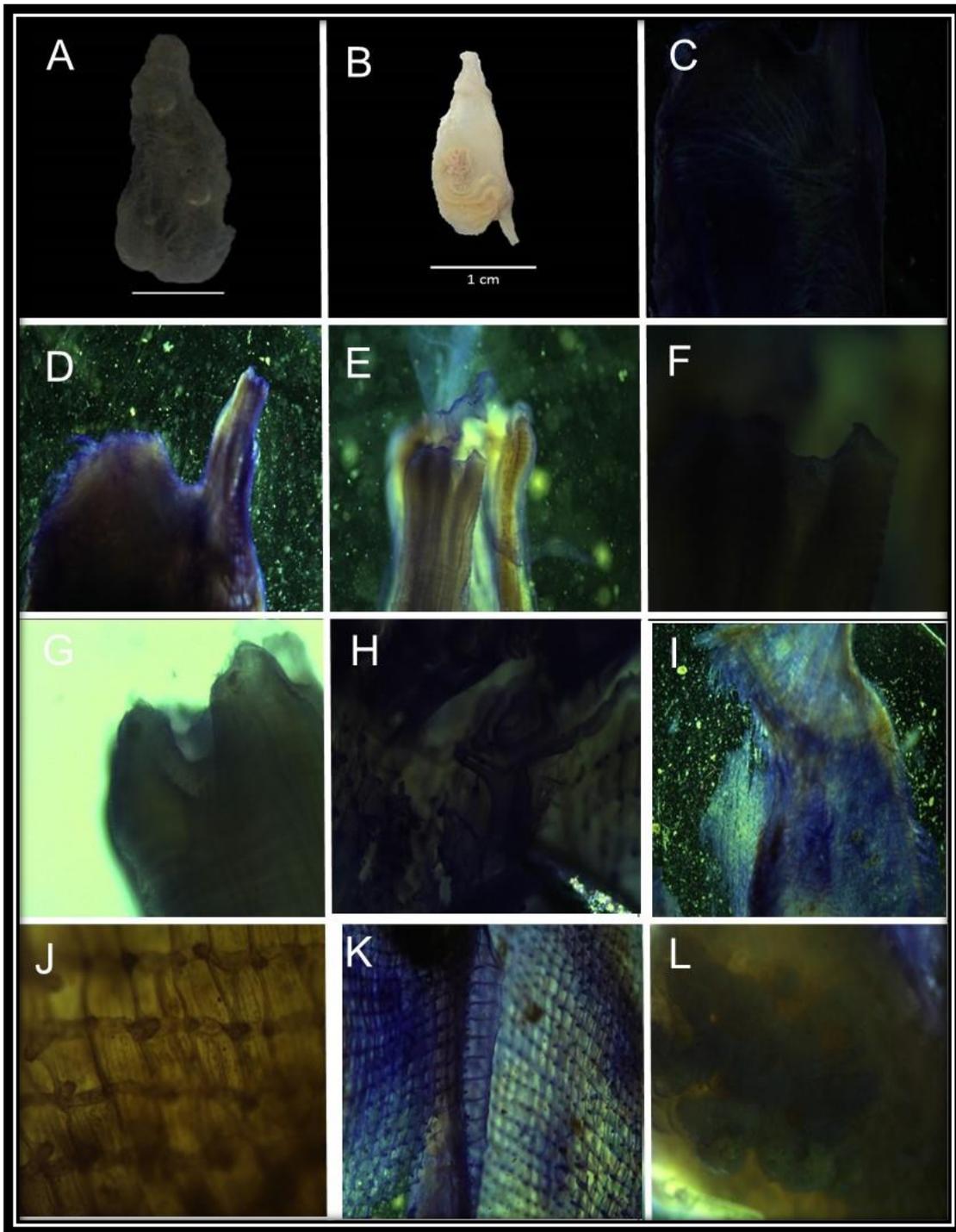


Lámina 17. *Ascidia cf. sydneisensis* Stimpson, 1855: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica; C) Musculatura externa; D) Sifón oral y atrial; E) sifón oral; F) Pigmentos en el sifón oral; G) Sifón atrial; H) Tubérculo dorsal; I) Ganglio neuronal; J) Papilas proyectadas en los vasos; K) Lámina dorsal; L) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Género *Phallusia* Savigny, 1816

***Phallusia* aff. *mammillata* (Cuvier, 1815)**

Ilustración 25.

Material examinado: SEM-TUN-382; Nayarit-Bahía de Banderas-Las Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario en forma de trapecio invertido, con proyecciones irregulares y voluminosas en los márgenes, cuyas dimensiones con túnica son 3.5 cm de largo y 4.3 cm de ancho (Ilustración 25).

La túnica es gruesa, cuyo grosor aumenta notoriamente en ambos sifones, alcanzando los 0.4 cm de ancho, el color es rosado con ligeros tonos morados, posee incrustaciones de algas. Ambos sifones se encuentran separados entre sí.

Distribución geográfica: En el noroeste del Atlántico, en el mar Caribe, en el canal de la Mancha y en el mar Mediterráneo (Shenkar *et al.*, 2018). En el Pacífico mexicano: en Bahía de Banderas, Nayarit.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

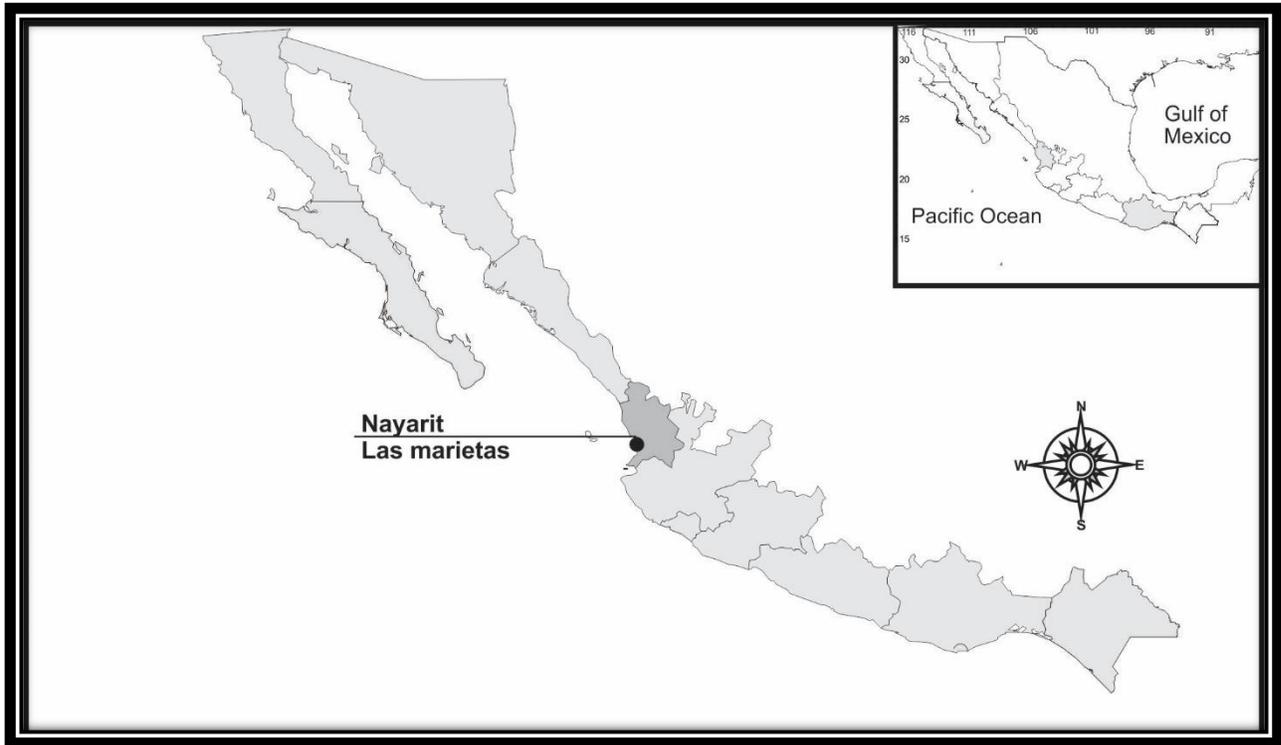


Ilustración 23. Distribución geográfica de *Phallusia* aff. *mammillata* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: El ejemplar no pudo ser completamente identificado debido a que no fue preservado para análisis morfológicos, por tal motivo, al ser disectado los órganos internos se encontraban deformados. Por ello, se tomaron en cuenta solo las características externas: coloración forma y las deformidades de la túnica, las cuales coinciden con fotografías para esta especie. Aunque su estatus está en duda, porque la especie está registrada para costas Atlánticas. Este sería el primer registro para el Pacífico oriental.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”



Ilustración 24. *Phallusia* aff. *mammillata* (Cuvier, 1815).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Phallusia aff. nigra* Savigny, 1816**

Ilustración 26.

Material examinado: SEM-TUN-387; Nayarit-Bahía de Banderas-Sayulita; Lat. 20°52'10", Long. 105°26'27"; 25/01/2018; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario, cuyas dimensiones con túnica son de 2.3 cm de alto y 1.1 cm de ancho (Ilustración 27).

La apariencia externa de la túnica es muy rígida y dura, presenta una coloración muy oscura (casi negro), con incrustaciones de ascidias de la familia Didemnidae, lo cual le proporciona una apariencia de poseer pigmentos blancos. Los sifones se encuentran separados entre sí por una distancia de 1.8 cm, éstos son muy anchos, casi igual de amplios que la parte ventral.

Distribución geográfica: Mar Egeo, mar Mediterráneo, en el Océano Atlántico: Bermudas, Caribe, Brasil y Golfo de México. En el Pacífico: Hawái y Bahía de Banderas (Shenkar *et al.*, 2018), Nayarit, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

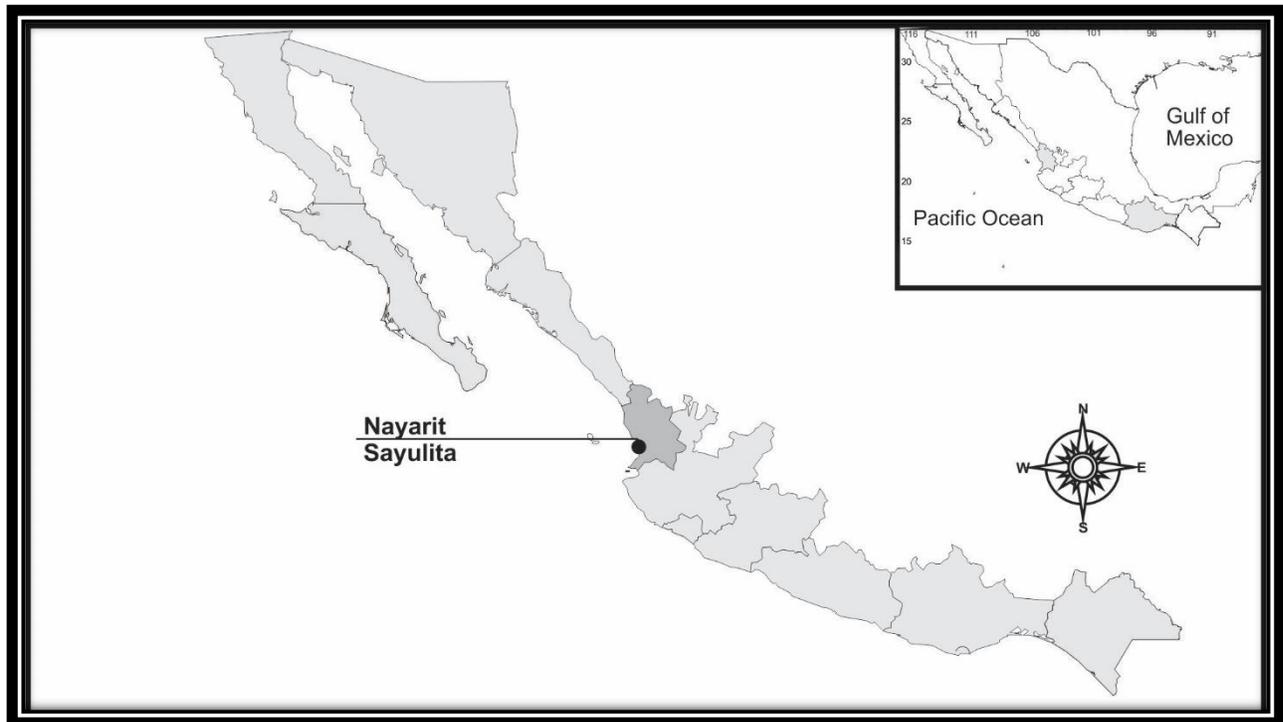


Ilustración 25. Distribución geográfica de *Phallusia* aff. *nigra* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios morfológicos: El ejemplar no pudo ser correctamente identificado debido a que no fue preservado para análisis morfológicos, debido a esto, al ser disectado los órganos internos se encontraban deformados. Por ello, se tomaron en cuenta solo las características externas: coloración y forma, las cuales coinciden con fotografías para esta especie. De confirmarse el estatus taxonómico, este sería el primer registro para el pacífico mexicano

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”



Ilustración 26. *Phallusia* aff. *nigra* Savigny, 1816.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Orden Stolidobranchia Lahille, 1886

Familia Pyuridae Hartmeyer, 1908

Género *Microcosmus* Heller, 1877

***Microcosmus exasperatus* Heller, 1878**

Lámina 18.

Sinonimias: *Ascidia dorsalis* Monniot, 1987, *Ascidia solomonensis* Nishikawa, 1986.

Material examinado: SEM-TUN-253; Sinaloa-Mazatlán-Isla Pájaros; Lat. 23°15'00", Long. 105°17'16"; 11/07/2014; Intermareal.; SEM-TUN-380; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06". 24/01/2018. Intermareal. SEM-TUN-391; Guerrero-Zihuatanejo-Sacramento; Lat. 17°37'55", Long. 101°36'36"; 27/01/2018; Intermareal. SEM-TUN-401; Guerrero-Zihuatanejo-Zacatoso; Lat. 17°39'13", Long. 101°37'19". 27/01/2018. Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario, en forma globular, cuyas dimensiones sin túnica son de 5.1 cm de ancho y 3.9 cm de largo (Lámina 18. A y B), mientras que con túnica alcanza los 6.2 cm de ancho y 6.9 cm de largo (Lámina 18. C). La túnica es de textura muy dura, rígida y rugosa, con incrustaciones de algas y coloración externa rojiza, mientras que por dentro el color se torna beige.

El organismo sin túnica presenta una coloración amarilla en la región torácica y rojiza en torno a ambos sifones. La musculatura es muy densa, en los sifones es circular externa, mientras que en el resto del cuerpo se compone de líneas longitudinales en la base y oblicuas en el centro las cuales bajan del sifón atrial hacia el endostilo. El sifón oral mide 0.9 mm de largo y 1.2 mm de ancho, presenta espinas (Lámina 18. D), mientras que el sifón atrial mide 0.8 mm de largo y 1.1 mm de ancho, ambos son tetralobulado (Lámina 18. E).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

El individuo disectado posee aproximadamente de 15 a 20 tentáculos orales ramificados en 2 órdenes de tamaño (Lámina 18. F). El área peritubercular en forma de “V” (Lámina 18. G) y tubérculo dorsal muy enroscado (Lámina 18. H), mide 1105.36 μm de largo y 909.11 μm de ancho. La lámina dorsal es dentada con aproximadamente 50 proyecciones (Lámina 18. I). La faringe con 6 pliegues de lado derecho y 5 de lado izquierdo, con 5 a 6 hileras de estigmas por malla y vasos parastigmáticos sobre ellas (Lámina 18. J).

En el área abdominal, el estómago es alargado, con presencia de endorcarpos cerca del intestino. La glándula digestiva es color marrón (Lámina 18. K). Las gónadas se encuentran en el lado derecho formando sacos (Lámina 18. L).

Distribución geográfica: Esta especie fue descrita por primera vez en el Mar Rojo (Heller, 1878). Posteriormente fue registrada en Costas del Océano Atlántico: desde Carolina del sur (Van Name, 1921) hasta Brasil y en costas del Pacífico: Australia (Kott, 1985), Guam y Filipinas (Millar, 1975), sur de California (Cohen *et al.*, 2005), Baja California Sur (Moreno-Dávila, 2013), Nayarit y Guerrero, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”



Ilustración 27. Distribución geográfica de *Microcosmus exasperatus* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios morfológicos: Los caracteres definitorios para la identificación de esta especie son: el tamaño, la apariencia y coloración externa (rojiza) e interna de la túnica, el número de tentáculos orales, el número de pliegues, gónadas en el intestino, coloración de la glándula digestiva, pero principalmente, el detalle que tiene mayor valor taxonómico es el tipo de espinas que presenta en el sifón oral. Todos estos caracteres taxonómicos están basados en la descripción realizada por Van Name (1945) y en la clave de identificación de Rocha *et al.*, (2012) y coinciden perfectamente con el ejemplar examinado. Con este estudio se amplía el registro de la especie en costas del Pacífico mexicano y se registra por primera vez en costas de Nayarit y Guerrero.

Código de Barras: Se obtuvo una secuencia de 621 pb, representativa del ejemplar SEM-TUN-253. Al comparar la secuencia con sus similares disponibles en Gen Bank, se observó que esta difiere en 17% a la secuencia más cercana que es un *Microcosmus squamiger* (Núm. De acceso EU486404.1).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

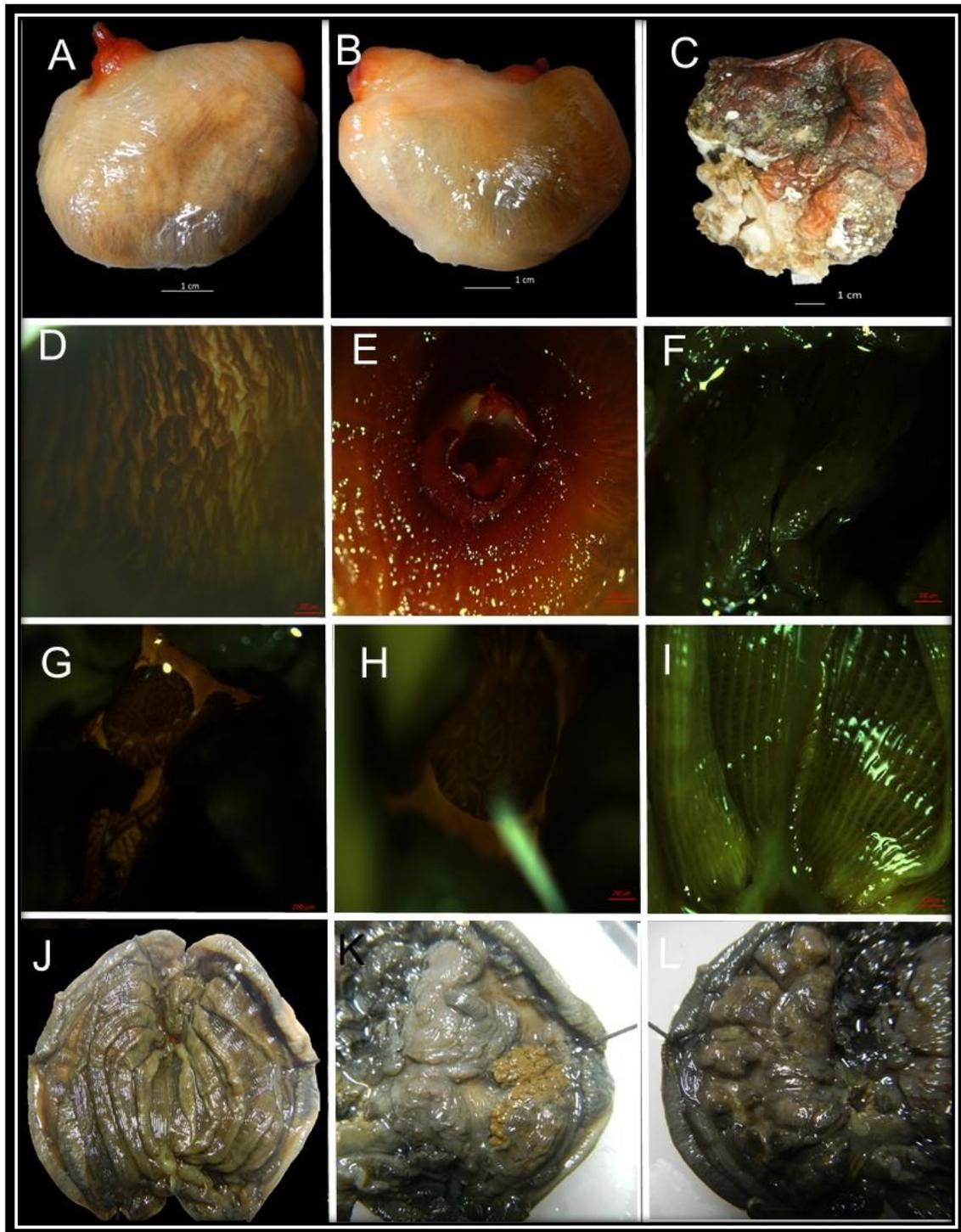


Lámina 18. *Microcosmus exasperatus* Heller, 1878: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica: lado derecho; C) Individuo sin túnica: lado izquierdo; D) Lóbulos orales; E) Espinas del sifón oral; F) Tubérculo dorsal; G) Área peritubercular; H) Tentáculos orales; I) Lámina dorsal; J) Individuo disectado: pliegues; K) Organismo disectado: lado derecho; L) Organismo disectado: lado izquierdo.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Género *Pyura* Molina, 1782

***Pyura haustor* (Stimpson, 1864)**

Lámina 19.

Sinonimias: *Cynthia erecta* Ritter, 1900; *Cynthia haustor* Stimpson, 1864; *Cynthia macrosiphonus* Ritter, 1900; *Halocynthia haustor* (Stimpson, 1864); *Halocynthia johnsoni* Ritter, 1909; *Halocynthia washingtonia* Ritter, 1913.

Material examinado: LEB-148; Oaxaca-Puerto Ángel; Lat. 15°39'49", Long. 96°28'53"; 05/12/2002; 1.5 metros. 158; Nayarit-Bahía de Banderas- Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 04/10/2002. Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de forma ovalada, tiene un ancho uniforme, cuyas dimensiones sin túnica son de 4.0 cm de ancho y 3.0 cm de largo (Lámina 19. A), mientras que con túnica alcanza los 5.2 cm de ancho y 4.9 cm de largo (Lámina 19. B). La túnica es de textura dura, firme y cartilaginosa, completamente cubierta por una colonia de *Didemnum*, por lo cual no se pudo apreciar la coloración. Además, presentaba incrustaciones de algas. El manto del cuerpo es de color amarillo pálido.

La musculatura es más pronunciada del lado derecho del individuo, no es compleja, ambos sífonos presentan musculatura circular conspicua externa, mientras que en la base se vuelven longitudinales internas y diagonales externas, principalmente más densas del sífon oral hacia el centro del manto.

El sífon oral y el sífon atrial se encuentran posicionados de manera horizontal, formando un ángulo cercano a los 45° con respecto de la base, con una distancia de 3.0 cm entre ambos. El sífon oral mide 0.8 cm de longitud y 3.8 de diámetro (Lámina 19. C), presenta aproximadamente 10 grandes tentáculos orales ramificados (Lámina 19. D). Mientras que el sífon atrial mide 1.1 cm de largo y 0.8 cm de diámetro, cuya margen es

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

lobado. Ambos sifones con 4 lóbulos de forma triangular (Lámina 19. E), no se encontraron manchas de pigmentos.

En la pared del cuerpo se encuentra el área peritubercular en forma de “V”, con un tubérculo dorsal en forma de “O”, los extremos muy proyectados, lo cual da una apariencia de presentar una forma de estrella (Lámina 19. F).

La faringe presenta 6 pliegues longitudinales en ambos lados (Lámina 19. G y H), con 4 o 5 estigmas entre cada vaso (Lámina 19. I). La lámina dorsal es continua con lengüetas pequeñas y poco visibles. La distribución aproximada de los vasos longitudinales contados de la lámina dorsal hacia el endostilo es la siguiente: Izquierda: 18 (12), 17 (12), 18 (16), 18 (17), 18 (15), 15 (13); derecha: 8 (10), 11 (13), 12 (13), 8 (14), 14 (20), 15 (13).

En estómago se encuentra rodeado del divertículo gástrico (Lámina 19. J). El intestino se ubica al lado izquierdo, es tan grande que abarca casi todo lo largo del individuo y es muy amplio, principalmente en la parte terminal, el cual presenta endocarpos. (Lámina 19. K) El ano carece de lóbulos. Las gónadas son saculiformes y ramificadas (Lámina 19. L).

Distribución geográfica: En la región de Puget Sound, Washington, en la costa de California (Van, Name, 1945), en el Pacífico mexicano: en costas de Nayarit (presente estudio) y en costa de Oaxaca anteriormente reportada por Moreno-Dávila (2010) y actualmente reportada en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

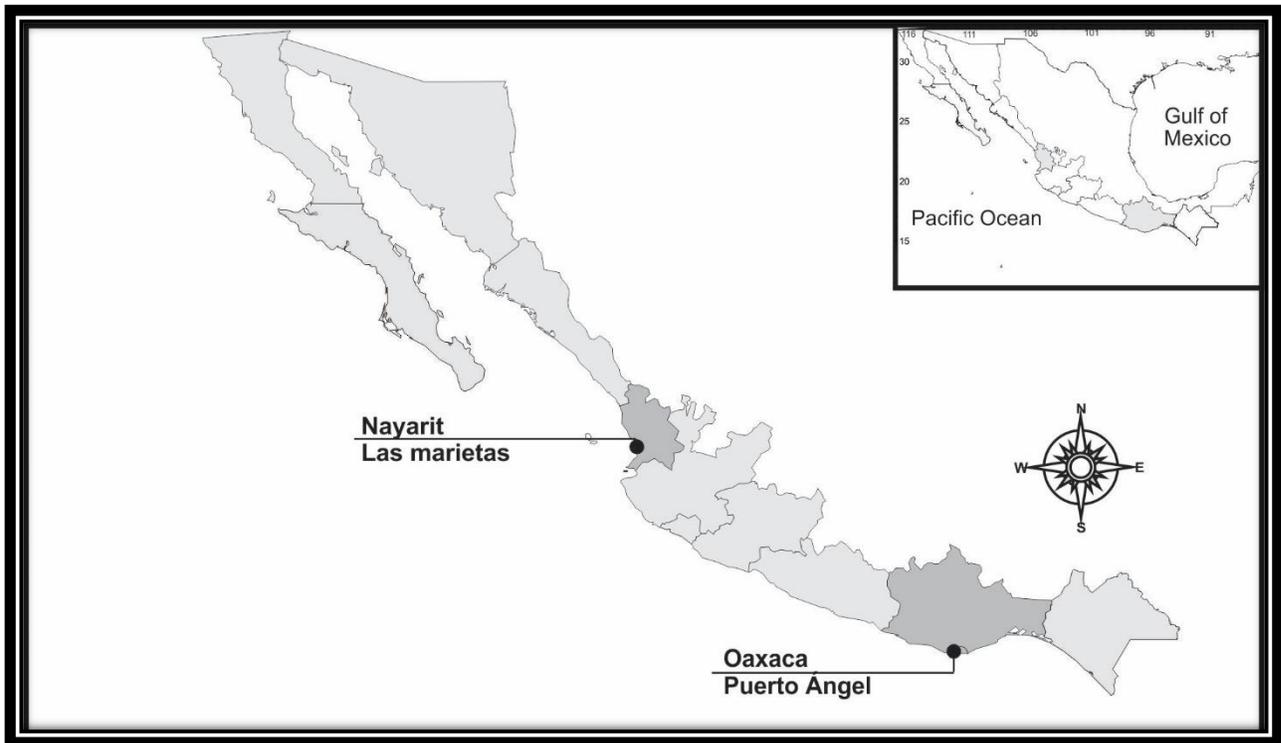


Ilustración 28. Distribución geográfica de *Pyura haustor* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios morfológicos: De acuerdo con la descripción realizada por Van Name (1945), el individuo analizado coincide con el tamaño, en el tipo de musculatura, en la presencia de endocarpos, en el tipo de lámina dorsal, el número de pliegues branquiales, el número de estigmas, el estómago y las gónadas. Sin embargo, en la misma descripción deja muy amplio el margen de identificación, ya que en su estudio menciona que: la forma, el tamaño corporal y de los sifones puede ser variable, la musculatura puede ser de varios tipos, el número tentáculos orales, estigmas, de vasos longitudinales y transversales por su parte variables. De los cuales, al menos el organismo analizado presenta alguna característica de la amplia gama de posibilidades, solamente difiere en la forma del tubérculo dorsal. Sin embargo, en otro estudio ya se ha reportado esta variabilidad para la misma especie (Moreno-Dávila, 2010). Con este estudio se amplía el registro de la especie para costas del Pacífico mexicano y se registra por primera vez en costas de Nayarit.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

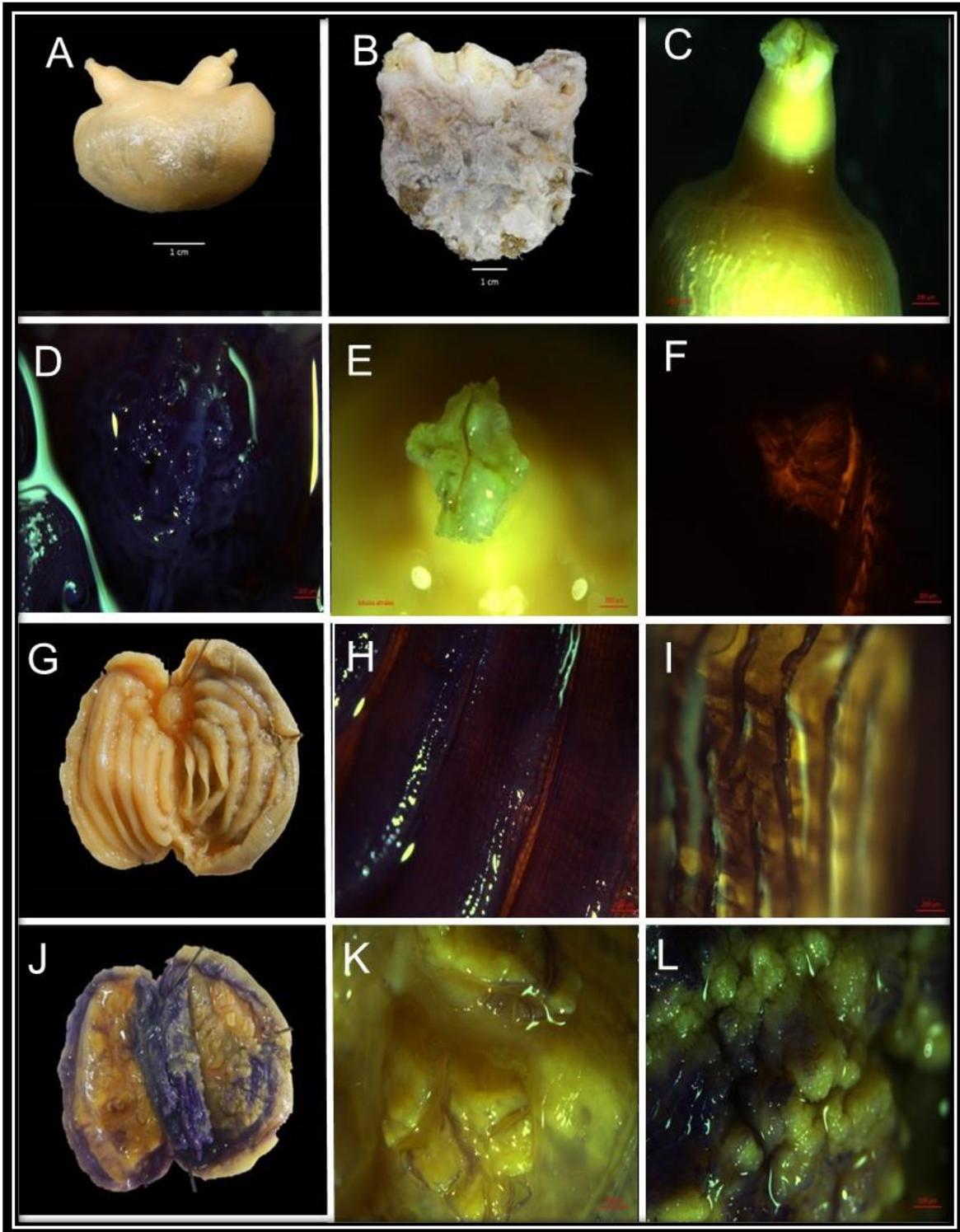


Lámina 19. *Pyura haustor* (Stimpson, 1864): A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica: lado; C) Sifón oral: musculatura; D) Lóbulos orales; E) Tentáculos orales; F) Tubérculo dorsal G) Pliegues torácicos; H) Pliegues; I) Estigmas; J) Divertículo gástrico; K) Endocarpos; L) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Pyura lignosa* Michaelsen, 1908**

Lámina 20.

Material examinado: 159 y 160; Jalisco- Puerto Vallarta- Mismaloya; Lat. 20°31'59", Long. 105°16'58"; 04/06/2000; Intermareal. SEM-TUN-319; Oaxaca-Huatulco-Cacaluta; Lat. 15°43'11.36", Long. 96°09'48.28"; 14/05/16; Intermareal. SEM-TUN-333; Oaxaca- Puerto Ángel-Muelle; Lat. 15°39'49.48", Long. 96°29'44.62"; 04/11/15; Intermareal. SEM-TUN-375 y SEM-TUN-375; Nayarit-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/18; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario con forma oval-alargada, cuyas dimensiones sin túnica son de 1.3 cm de ancho y 1.5 cm de largo (Lámina 20. A), mientras que con túnica alcanza los 1.9 cm de ancho y 2.0 cm de largo. La túnica es de textura dura, firme, cartilaginosa y arrugada, se encuentra libre de partículas, pero con ligeras espinas en algunas partes, la coloración en uno de los ejemplares es amarilla ocre, con ligeros puntos de pigmentos color naranja (Lámina 20. B), mientras que en el otro ejemplar su color es naranja de la base y ligeramente amarilla de la parte superior. Independientemente de las arrugas que presenta la superficie, la túnica posee en la superficie una serie de divisiones poligonales diminutas, las cuales se asemejan a escamas. Los sifones no son prominentes en la superficie. Los individuos se encontraban unidos al sustrato de la parte ventral o a un costado. El manto del cuerpo es de color amarillo pálido.

La musculatura es igual de pronunciada en ambos lados del cuerpo, es tan densa que cubre completamente los órganos internos, lo cual impide apreciarlo a simple vista. Los sifones poseen musculatura circular externa y longitudinal interna, dicha musculatura no forma bandas en los lóbulos (Lámina 20. C y D). Mientras que el resto el cuerpo presenta largas bandas oblicuas de amplio grosor.

El sifón oral (Lámina 20. C) se encuentra de manera horizontal formando en ángulo de 90° con respecto de la base, mide 5.0 mm de longitud y 4.0 mm de ancho, con

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

un margen tetralobulado, presenta aproximadamente 10 tentáculos orales muy delgados y poco ramificados (Lámina 20. E). Mientras que el sifón atrial se encuentra posicionado a 180° respecto a la base, mide 3.1 mm de longitud y 1.6 mm de ancho, este no posee lóbulos, es liso y completamente circular. Ambos sifones presentan un margen sin presencia de manchas de pigmentos.

La faringe presenta 6 pliegues de ambos lados (Lámina 20. F), los cuales poseen vasos longitudinales y transversales. La distribución aproximada de los vasos longitudinales contados en cada pliegue empezando la lámina dorsal hacia el endostilo, es la siguiente: de lado derecho: 1 (14), 2 (16), 3 (18), 4 (18), 5 (16) y 6 (12), en el lado izquierdo: 1 (18), 2 (18), 3 (18), 4 (18) y 5 (14). Entre cada vaso longitudinal se encuentran series de 3 a 5 estigmas. Además, posee vasos parastigmáticos irregulares, es decir, pueden encontrarse en algunas hileras de estigmas y en otras no (Lámina 20. G)

En la pared del cuerpo se encuentra el área peritubercular en forma de “V” (con ondulaciones en los costados), con un tubérculo dorsal en forma de “U” (Lámina 20. H), con las orillas dobladas hacia el centro. La lámina dorsal posee aproximadamente 70 lengüetas (Lámina 20. I). El ganglio neuronal en medio de ambos sifones.

El intestino se encuentra de lado izquierdo. El ano es ligeramente lobado (Lámina 20. J). El divertículo gástrico (Lámina 20. K) y las gónadas (Lámina 20. L) presente en ambos lados. En el lado izquierdo, las gónadas se encuentran parcialmente rodeadas del asa intestinal, mientras que, en el lado derecho alojadas en el manto, su forma es saculiforme y surgen de una proyección tubular en la cual se localiza el oviducto y espermiducto.

Distribución geográfica: La especie fue identificada por primera vez en Punta Arenas, Costa Rica (Michaelsen, 1908). Posteriormente fue registrada en: Isla Guadalupe (Monniot, 1983), Golfo de California (Van Name, 1945), en el Pacífico mexicano: Bahía de La Paz, Baja California Sur (Moreno-Dávila, 2013), en Bahía de Banderas, Nayarit, Puerto Vallarta, Jalisco y Cacaluta, Oaxaca, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

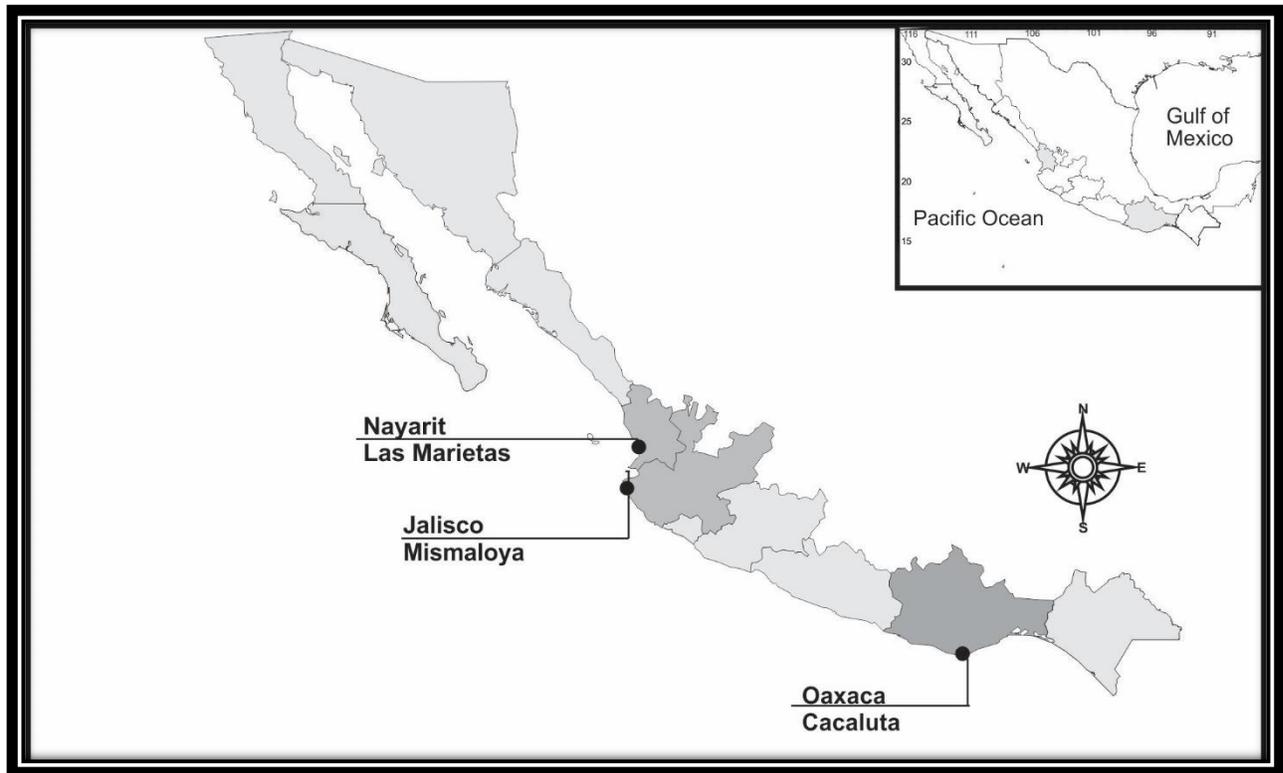


Ilustración 29. Distribución geográfica de *Pyura lignosa* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: A diferencia de la descripción realizada por Van Name (1945) para la misma especie, los individuos examinados poseen una musculatura más densa, lo cual imposibilita ver los órganos a través de ella. Sin embargo, esta especie está caracterizada por presentar dos tipos de arreglos de los sifones y detalles en forma de escama en la túnica, estas características fueron encontradas en nuestros ejemplares, los cuales fueron determinantes para definir la especie.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

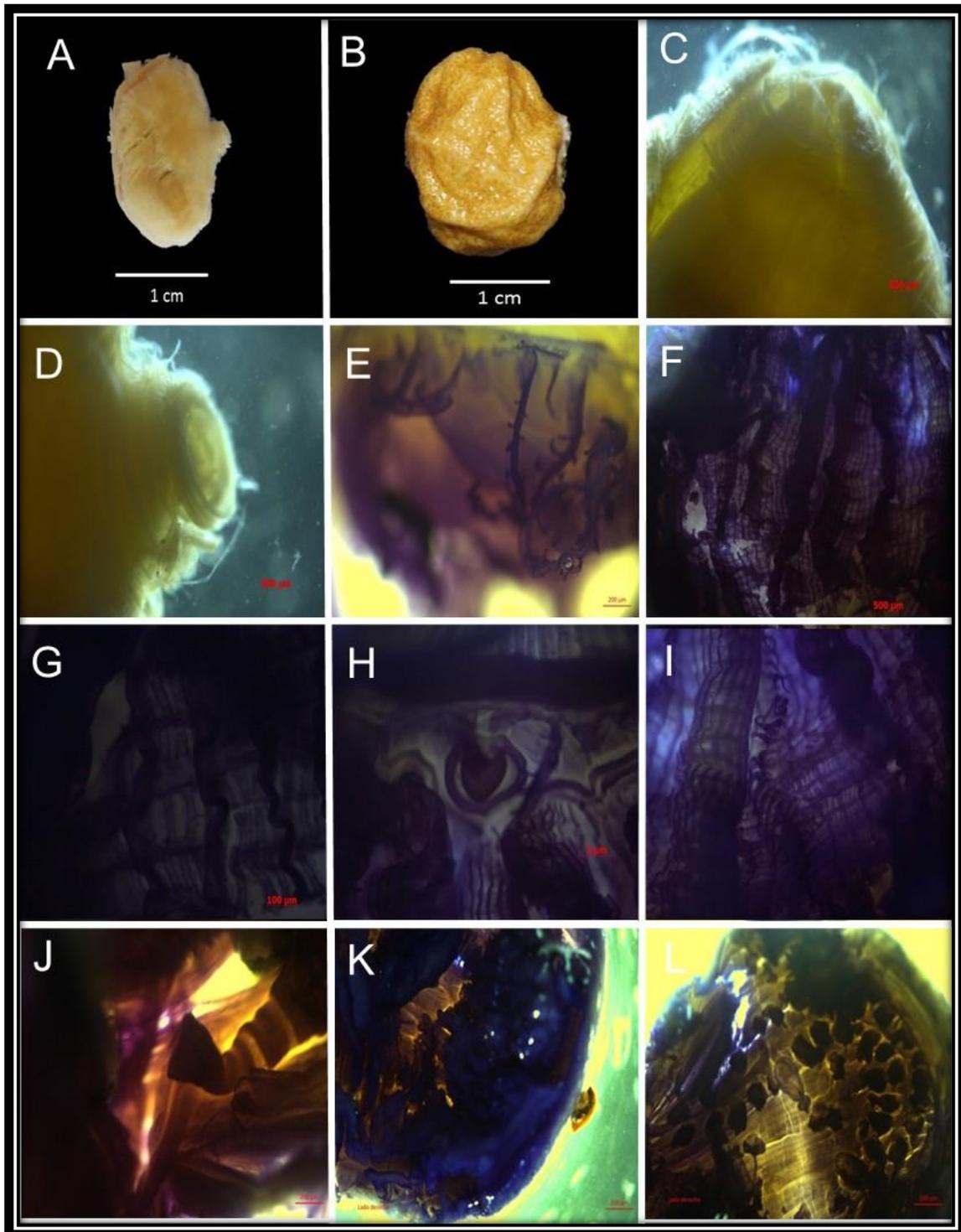


Lámina 20. *Pyura lignosa* Michaelsen, 1908: A) Individuo sin túnica; B) Individuo con túnica; C) Sifón oral; D) Sifón atrial; E) Tentáculos orales; F) Pliegues branquiales; G) Estigmas; H) Tubérculo dorsal; I) Lámina dorsal; J) Ano; K) Divertículo gástrico; L) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Pyura* sp.**

Lámina 21.

Material examinado: SEM-TUN-417; Guerrero-Zihuatanejo-El Morro de Potosí; Lat. 17°32'03", Long. 101°30'05"; 28/01/2018; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario, con forma redondeada, sus dimensiones con túnica alcanzan los 3.0 cm de largo y 4.0 cm de ancho. La apariencia externa de la túnica es rugosa y dura, la coloración externa es rojiza, con incrustaciones de algas y tubos de poliquetos (Lámina 21. A).

El organismo sin túnica presenta una coloración amarillo claro en el manto, mientras que en los sifones dicha coloración se acentúa a un color rojizo. La musculatura es muy notoria del lado izquierdo del individuo (Lámina 21. B), está conformada por pronunciadas y numerosas bandas circulares y pocas líneas longitudinales en ambos sifones, dichas bandas circulares bajan del sifón oral hacia la región central del manto, en donde la musculatura se vuelve más densa. Además, presenta proyecciones en forma de espinas a lo largo y ancho de su musculatura (Lámina 21. C). Mientras que, de lado derecho dicha musculatura es prácticamente inexistente, dejando al descubierto sus órganos internos (Lámina 21. D).

Los sifones son muy anchos y cortos, separados entre sí por una distancia de 2.7 cm, ambos poseen 4 lóbulos en forma redondeada en sus bordes (Lámina 21. E). Sin túnica: el sifón oral es más corto que el atrial.

El organismo disectado posee en el área torácica aproximadamente 10 tentáculos orales ramificados, los cuales se encuentran muy dispersos entre sí. Además de presentar un área peritubercular en forma de “V” (Lámina 21. F) y un tubérculo dorsal amorfo (Lámina 21. G), cuyos bordes se doblan el centro. La lámina dorsal es continua. Mientras que la región faríngea presenta pliegues: 5 de lado derecho y 6 de lado izquierdo (Lámina 21.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

H), con 5 hileras de estigmas y vasos parastigmáticos sobre ellos (Lámina 21. I). La Lámina dorsal posee lengüetas (aproximadamente 100).

En el área abdominal se encuentran las gónadas saculiformes y ramificadas (Lámina 21. J), mientras que a un costado del intestino presenta endorcarpos (Lámina 21. K) y un divertículo gástrico (Lámina 21. L).

Distribución geográfica: En el Pacífico mexicano: El morro de Potosí, Guerreroit.



Ilustración 30. Distribución geográfica de *Pyura* sp., en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: El mínimo nivel taxonómico no se logró establecer ya que no se encontró mucha similitud a especies del género *Pyura* reportadas en costas del Pacífico mexicano. Una característica distintiva de la especie es la presencia de proyecciones en el manto, las cuales pueden tener un valor de carácter taxonómico. Con este estudio se registra por primera vez a la especie en costas del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

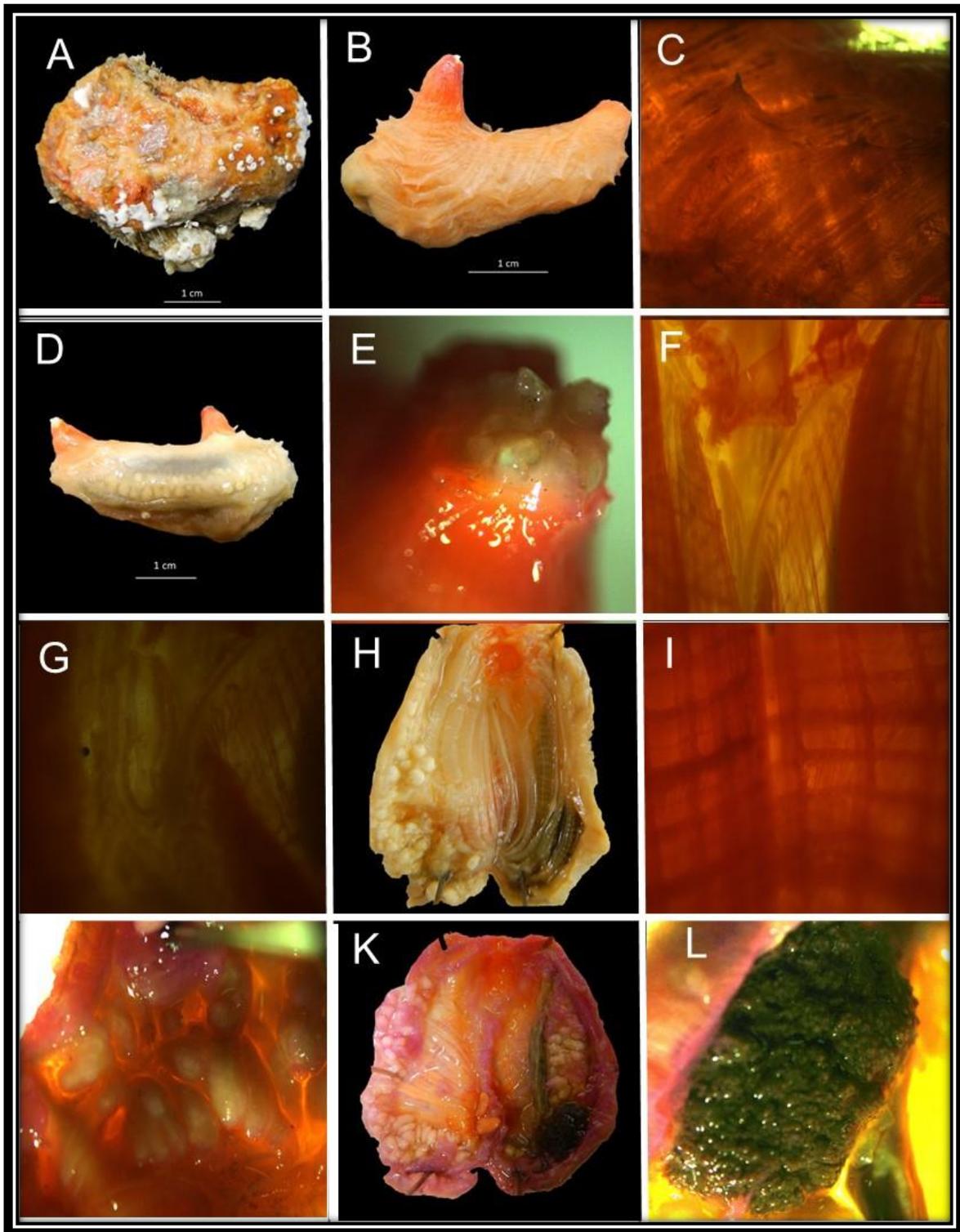


Lámina 21. *Pyura* sp.: A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica: lado derecho; C) Espinas; D) Individuo sin túnica: lado izquierdo; E) Lóbulos orales; F) Área peritubercular; G) Tubérculo dorsal; H) Individuo, Kdisectado: Pliegues; I) Faringe: vasos longitudinales; J) Gónadas; K) Intestino; L) Divertículo gástrico.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Pyura* aff. *squamulosa* (Alder, 1863)**

Ilustración 32.

Material examinado: SEM-TUN-375 y 376; Nayarit-Bahía de Banderas-Cueva Marietas; Lat. 20°41'56", Long. 105°35'06"; 24/01/2018; 6 metros.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de pequeño tamaño de aproximadamente 2.5 cm de ancho y 2 cm de alto, se encontró adherido al sustrato de parte ventral.

La túnica es muy dura y corácea cuya coloración en vida es rosada, con ligeros bordes redondeados, los cuales se propagan de la mitad superior de la túnica hasta los sifones, los cuales presentan una coloración rojiza y le confieren una particularidad específica que lo hace diferente a otras especies.

Los sifones se encuentran separados entre sí, formando ángulos de aproximadamente 90°, cuyos márgenes son tetralobulados.

Distribución geográfica: Esta especie fue identificada por primera vez en las islas Británicas (Alder, 1863), posteriormente ha sido registrada en el mar Mediterráneo (costa de Italia), aguas europeas (costas de Reino Unido, Irlanda, Francia y España) (EOL, 2018) y en costa del Pacífico mexicano (Bahía de Banderas, Nayarit), en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”



Ilustración 26. Distribución geográfica de *Pyura* aff. *squamulosa* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: La identificación del ejemplar está basado en la apariencia externa del individuo y su semejante parecido a fotografías (tomadas de la web) capturadas a esa especie, esto debido a que el individuo fue conservado para análisis moleculares, por ello, las estructuras internas se deformaron de tal manera que su identificación basada en la herramienta tradicional se complicó.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”



Ilustración 27. *Pyura* aff. *squamulosa* (Alder, 1863)

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Pyura stolonifera* (Heller, 1878)**

Lámina 22.

Sinonimias: *Cynthia praeputialis* Heller 1878, *Cynthia stolonifera* Heller, 1878, *Cynthiopsis coalitus* (Sluiter, 1898), *Cynthiopsis praeputialis* (Heller, 1878), *Halocynthia vanhaffeni* Michaelsen, 1904, *Halocynthia vanhoeffeni* Michaelsen, 1904, *Halocynthia vanhoffeni* Michaelsen, 1904, *Microcosmus coalitus* Sluiter, 1898, *Pyura bradleyi* Van Name, 1931, *Pyura violacea* Peres, 1949.

Material examinado: LEB-131; Jalisco-Puerto Vallarta- Los Arcos; Lat. 20°32'41, Long. 105°17'28"; 04/06/2003; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario en forma de trapecio invertido, cuyas dimensiones sin túnica son de 2.0 cm de ancho y 1.8 cm de largo (Lámina 19. A y B), mientras que con túnica alcanza los 2.1 cm de ancho y 1.9 cm de largo. La túnica es de textura dura, firme y cartilaginosa, se encuentra completamente cubierta de granos de arena, lo cual le proporciona una coloración café y dificulta la observación de los sifones, los cuales se confunden con el resto del cuerpo (Lámina 19. C). El manto del cuerpo es de color ligeramente parduzco.

La musculatura es más pronunciada del lado derecho del individuo, no es compleja, los sifones poseen musculatura circular externa y longitudinal interna (Lámina 19. D). Mientras que el manto sólo presenta largas bandas longitudinales de amplio grosor, estas líneas cubren los órganos del individuo.

El sifón oral y el sifón atrial se encuentran de manera horizontal y en ángulo cercano a los 90° con respecto de la base. El sifón oral mide 0.09 mm de longitud, presenta aproximadamente 8 tentáculos orales muy gruesos y ramificados (Lámina 19. E). Mientras que el sifón atrial es más largo que el oral, mide 1.5 mm de longitud y 1.3 mm de ancho. Ambos sifones presentan un margen de 4 lóbulos triangulares sin presencia de manchas de pigmentos (Lámina 22. F).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

La faringe presenta 6 pliegues en ambos lados, los cuales poseen vasos longitudinales y transversales (Lámina 22. G). La distribución aproximada de los vasos longitudinales contados en cada pliegue empezando la lámina dorsal hacia el endostilo, es la siguiente: de lado derecho: 1 (18), 2 (14), 3 (18), 4 (18), 5 (16) y 6 (10), en el lado izquierdo: 1 (24), 2 (18), 3 (20), 4 (16), 5 (14) y 6 (10). Entre cada vaso longitudinal se encuentran 4 series de estigmas. Además, en la faringe se encontró presencia de espículas calcáreas en forma recta y estelada, de aproximadamente 406.504 μm de longitud (Lámina 22. H).

En la pared del cuerpo se encuentra el área peritubercular en forma de “V” (con ondulaciones en los costados), con un tubérculo dorsal en forma cónica-espiral) (Lámina 22. E), este tiene una proyección que se dirige hacia el ganglio, el cual se encuentra entre ambos sifones (Lámina 22. I). La lámina dorsal es continua con 42 lengüetas.

El intestino es grande, abarca más de la mitad del cuerpo y se encuentra de lado izquierdo. El ano es multilobado, con 18 lóbulos (Lámina 22. J). El divertículo gástrico (Lámina 22. K) y las gónadas (Lámina 22. L) presente en ambos lados. En el lado izquierdo hay aproximadamente 40 sacos de gónadas, los cuales se encuentran parcialmente rodeadas del asa intestinal, mientras que en el lado derecho existen aproximadamente 70 grandes sacos de gónadas, alojadas en el manto, los cuales surgen de una proyección tubular en la cual se localiza el oviducto y espermiducto.

Distribución geográfica: La especie fue descrita por primera vez en el Océano Atlántico (Heller, 1878), Posteriormente fue registrada en: El Océano Indico: Sudáfrica (Heller, 1878; Kalk, 1958; Monniot y Monniot, 1976; Millar, 1955 y 1962), Pacífico oriental: Zorritos Perú y Bahía Santa Elena, Ecuador. En el Pacífico mexicano: Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010) y Los Arcos, Jalisco, en el presente estudio.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

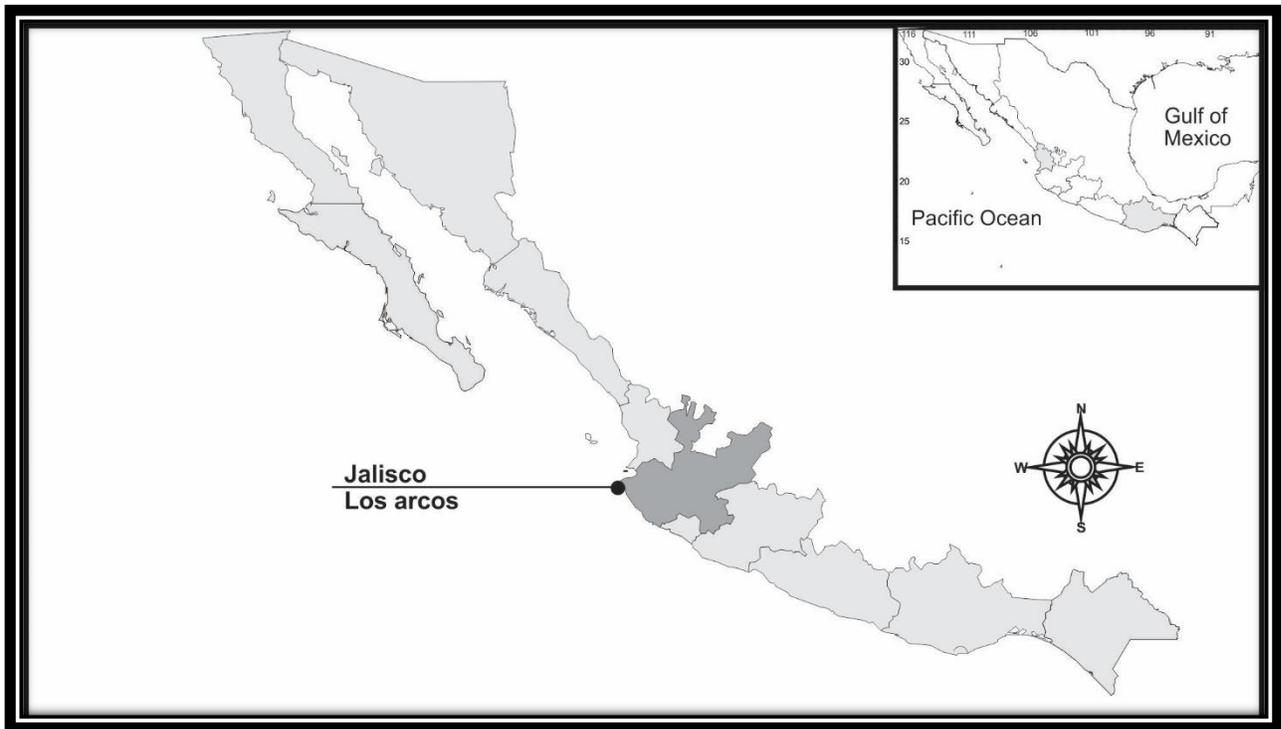


Ilustración 28. Distribución geográfica de *Pyura stolonifera* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios morfológicos: *Pyura stolonifera* fue descrita en 1878 por Heller para el Océano Atlántico, años después, en el Océano Pacífico fue descrita por Van Name (1931) describió *Pyura bradleyi*. Sin embargo, después de corroborar el estatus taxonómico fue sinonimizada como *Pyura stolonifera*.

El individuo analizado en este estudio coincide con la descripción realizada por Van Name (1931), excepto el número de gónadas observadas, en este trabajo se registra un mayor número de gónadas. Con este estudio se amplía el registro de la especie en costas del Pacífico mexicano y se registra por primera vez en las costas de Jalisco.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

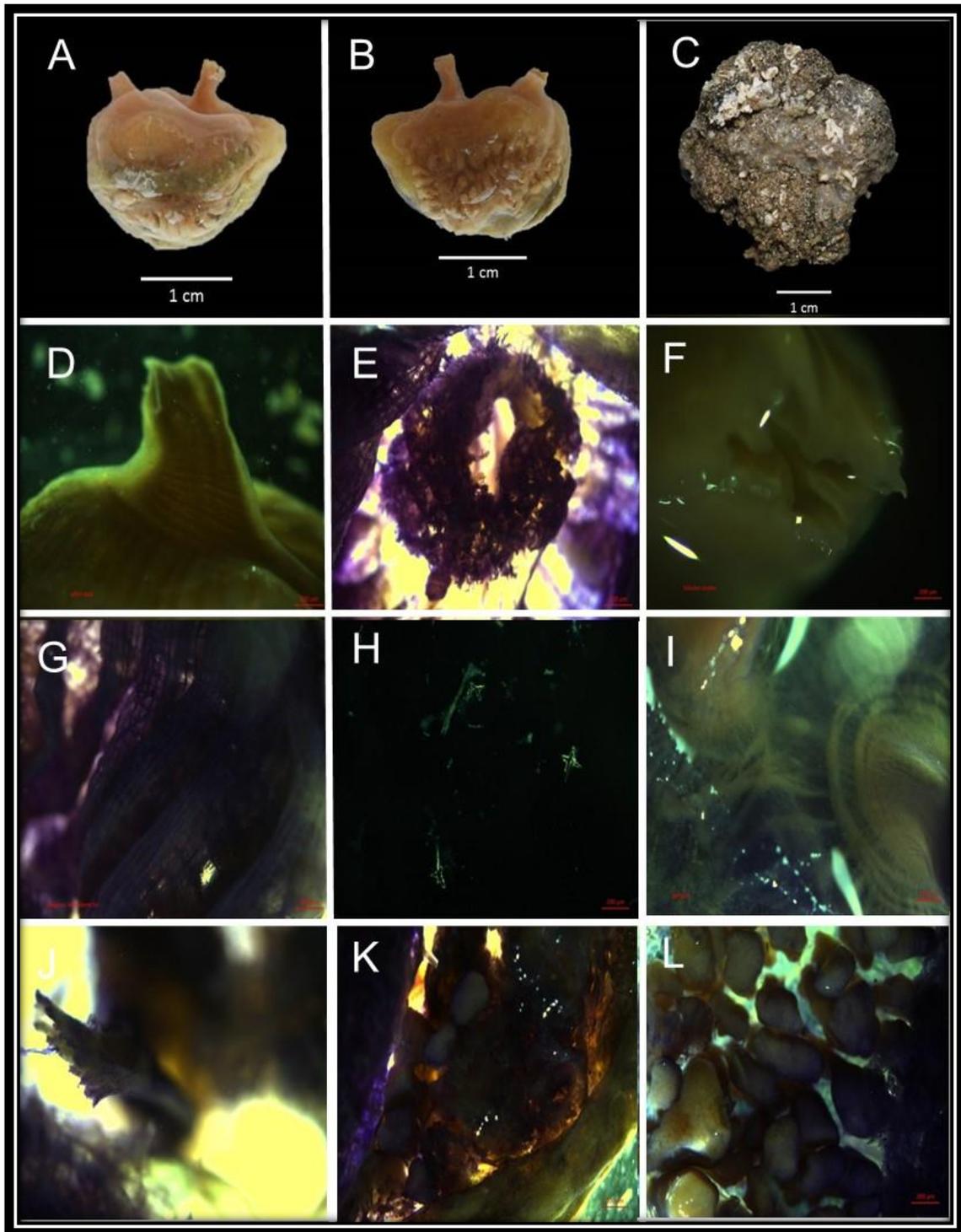


Lámina 22. *Pyura Stolonifera* (Heller, 1878): A) Individuo sin túnica: lado izquierdo; B) Individuo sin túnica: lado derecho; C) Individuo con túnica; D) Musculatura del sifón oral; E) Tentáculos orales y tubérculo dorsal; F) Lóbulos orales; G) Pliegues branquiales; H) Espículas; I) Ganglio neuronal; J) Lóbulos anales; K) Divertículo gástrico; L) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Familia Styelidae Sluiter, 1895

Género *Metandrocarpa* Michaelsen, 1904

***Metandrocarpa* cf. *michaelseni* Ritter y Forsyth, 1917**

Lámina 23.

Sinonimias: *Metandrocarpa* cf. *Michaelseni* Ritter y Forsyth, 1917

Material examinado: LEB-169; Nayarit-Bahía de Banderas-Tecuchitán; Lat. 20°43'55", Long. 105°24'43"; 05/10/2011; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen colonial con forma globular. La túnica es de textura dura, firme y cartilaginosa, se encuentra libre de partículas, la coloración es blanca-traslúcida (Lámina 23. A). La colonia se encuentra unida por estolones (Lámina 21. B) y unida completamente al sustrato de la parte posterior, dejando libre solamente ambos sifones.

Los zooides se encuentran completamente comprimidos, cuyas dimensiones aproximadas son de 1.4 mm de ancho y 0.07 mm de largo. Los sifones se encuentran muy próximos con una separación de 505.36 µm entre sí, ambos de manera horizontal, formando ángulos de 90° respecto a la base. El sifón oral posee aproximadamente 12 tentáculos lisos de diferentes tamaños, todos ellos muy separados entre sí (Lámina 23. C y D).

En la pared del cuerpo se encuentra un área peritubercular en forma de “V” con un tubérculo dorsal en forma de óvalo (Lámina 23. E). La lámina dorsal es continua. La faringe posee 14 hileras de estigmas (Lámina 23. F).

El intestino se encuentra del lado izquierdo. El estómago es ovalado, amplio y posee aproximadamente 9 pliegues (Lámina 23. G). El ano es multi lobado (Lámina 23. H). Las gónadas se encuentran en la pared del cuerpo, las gónadas femeninas consisten en 5 o 6 ovarios pequeños de aproximadamente 258. 24 µm de diámetro (Lámina 23. I).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Distribución geográfica: La especie fue registrada por primera vez al norte y sur de California, USA (Ritter y Forsyth, 1917; Van Name, 1945). En este estudio solamente se encontró en Bahía de Banderas, Nayarit, en el presente estudio.

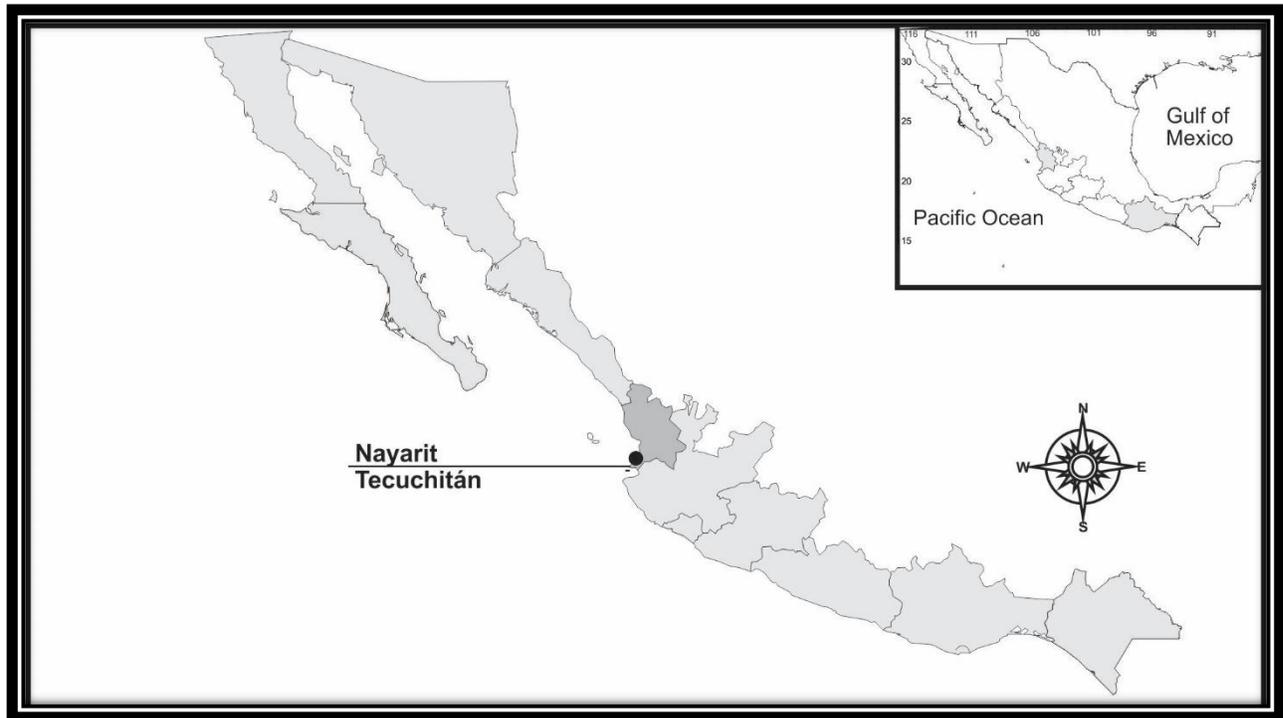


Ilustración 29. Distribución geográfica de *Metandrocarpa* cf. *michaelsoni* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxonómicos: Nuestros ejemplar encajan muy bien con la descripción de *Metandrocarpa michaelsoni* dada por Van Name (1945), incluso las ilustraciones son muy similares a lo observado en nuestro individuo.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

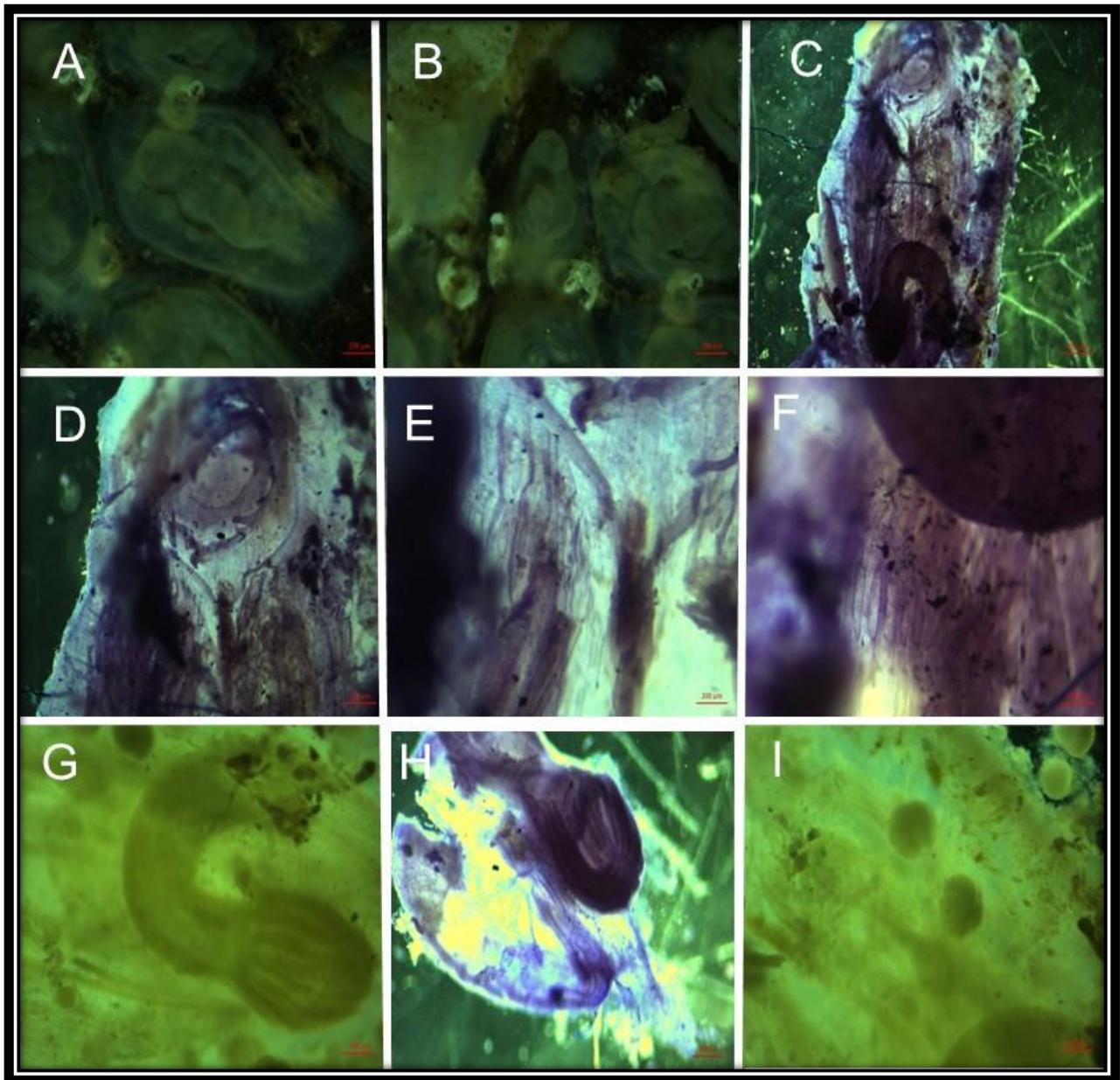


Lámina 23. *Metandrocarpa* cf. *michaelsoni* Ritter y Forsyth, 1917: A) Colonia 1; B) Colonia 2; C) Individuo disectado; D) Tentáculos orales; E) Área peritubercular; F) Tubérculo dorsal; G) Estigmas; H) Estómago; I) Ano; J) Gónadas.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

***Styela canopus* (Savigny, 1816)**

Lámina 24.

Material examinado: LEB-67; Jalisco-Puerto Vallarta- Los Arcos; Lat. 20°32'41", Long. -105°17'28"; 08/04/2002; Intermareal.

Descripción morfológica: Espécimen solitario de forma ovalada, que con túnica mide 1.4 cm de ancho y 1.2 cm de largo (Lámina 24. A), sobre ella presenta muchas irregularidades e incrustaciones de algas. Mientras que, sin túnica el cuerpo mide 1.1 cm de largo y 1.2 cm de ancho (Lámina 24. B), la forma es completamente diferente, se caracteriza por presentar un cuerpo más ancho que largo, ambos sifones muy próximos entre sí y desviados hacia la derecha (Lámina 24. C).

La musculatura es de la siguiente manera: en los sifones presenta bandas longitudinales externa, las cuales se van uniendo a la base, en donde la musculatura se vuelve circular y transversal hasta cubrir el resto del manto.

El ejemplar presenta sifones alargados, ambos del mismo tamaño con una longitud de 497.10 μm de largo y 376.14 μm de ancho, con 4 lóbulos alargados y redondeados (Lámina 24. D). El sifón oral posee aproximadamente 40 tentáculos orales ramificados (Lámina 24. E).

El saco branquial es plegado, con 5 pliegues de lado derecho y 4 de lado izquierdo (Lámina 24. F), en ellos se encuentran vasos longitudinales, parastigmáticos y 9 hileras de estigmas entre cada malla (Lámina 24. G). En la pared de cuerpo se encuentra el área peritubercular muy pequeña y un tubérculo dorsal diminuto en forma de “o” (Lámina 24. H). El intestino está en el lado izquierdo, el cual es alargado y en forma de “C” (Lámina 24. I), sobre el estómago se encuentra un divertículo gástrico pequeño (Lámina 24. J).

Las gónadas se ven fácilmente a simple vista a través del manto (Lámina 24. K), se encuentran 2 de cada lado. Cada uno comprende un ovario alargado, sinuosamente curvado, con el extremo dirigido hacia el sifón auricular. El ovario está bordeado a cada

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

lado por pequeños testículos que varían de forma, con varias ramas irregulares, estos se encuentran a poca distancia del ovario; sus conductos van hacia el ovario, sobre cuya superficie libre se unen para formar el conducto espermático común (Lámina 24. L).

Distribución geográfica: La especie fue registrada por primera vez en el puerto de Boston como *Styela Partita* por (Stimpson, 1852). Posteriormente fue sinonimizada a *Styela canopus* (Savigny, 1816), la cual ha sido registrada en costas del Océano Atlántico: en Massachusetts, Florida, las Antillas, Cuba, Puerto Rico y Curacao. En el lado europeo desde islas Anglonormandas y costa oeste de Francia hasta islas de Cabo verde y África occidental tropical. En el Pacífico: En Isla Toboguilla, Panamá (Van Name, 1945), Oaxaca (Moreno-Dávila, 2010) en Puerto Vallarta, Jalisco, en el presente estudio.

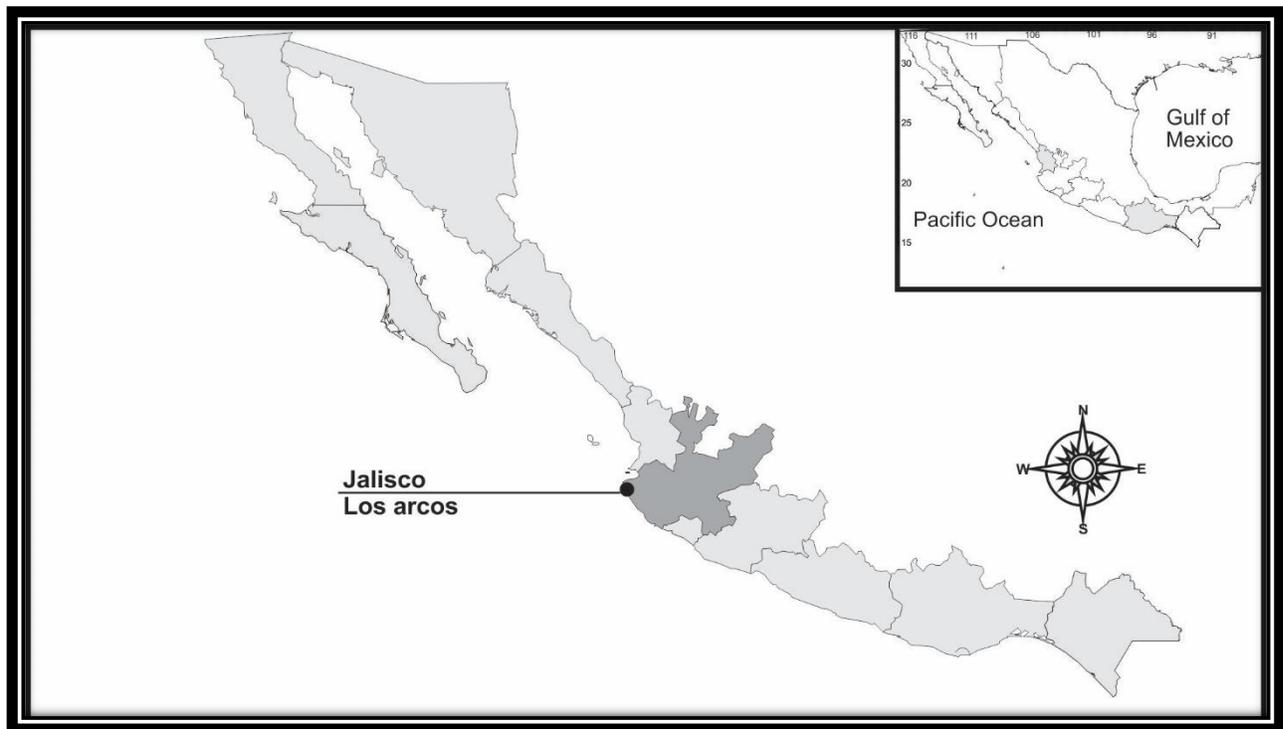


Ilustración 30. Distribución geográfica de *Styela canopus* en ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano.

Comentarios taxónómicos: La principal característica distintiva de esta especie es la forma y distribución de las gónadas, las cuales al ser comparadas con la descripción

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

realizada por Van Name (1945) coincide en su totalidad. Con este estudio se registra por primera vez la especie en las costas del Pacífico mexicano.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

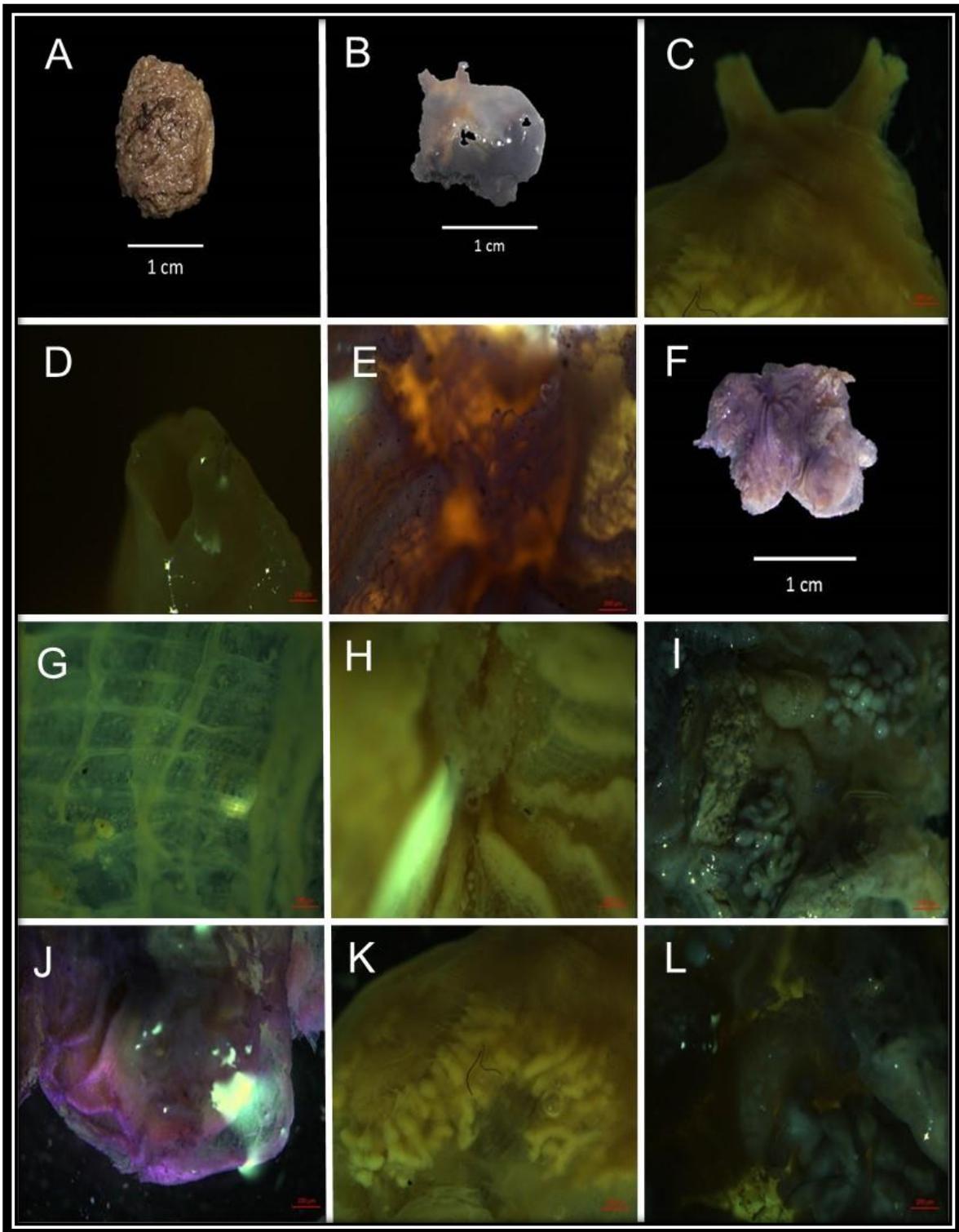


Lámina 24. *Styela canopus* (Savigny, 1816): A) Individuo con túnica; B) Individuo sin túnica; C) Sifones: oral y atrial; D) Lóbulos orales; E) Tentáculos orales; F) Pliegues; G) Estigmas; H) Tubérculo dorsal; I) Intestino; J) Divertículo gástrico; K) Gónadas; L) Ovocitos.

7.2 Resultados moleculares

7.2.1 Extracción de ADN

Se realizó el procedimiento de extracción de ADN genómico a 140 individuos, del cual 70 ejemplares fueron considerados como resultados favorables (por presentar bandas de buena calidad). Por lo tanto, el porcentaje de éxito fue del 54%.

La calidad y cantidad de ADN fue variable entre los individuos sometidos a este procedimiento (Ilustración 31) y dependiendo de esto, se prepararon distintas diluciones (1:10, 1:20, 1:30, 1:50 y 1:100), con la finalidad de obtener una concentración adecuada para la amplificación de fragmentos de ADN de interés. En los casos donde la concentración fue baja, no se realizaron diluciones.

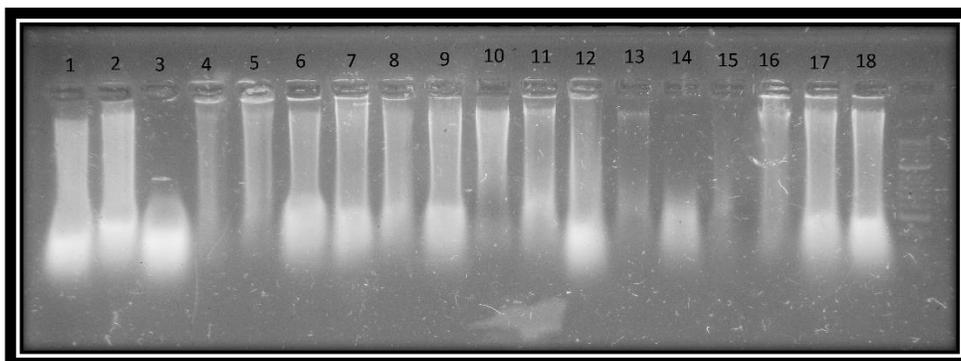


Ilustración 31. Electroforesis en gel de agarosa: extracciones de ADN de algunas ascidias.

7.2.2 Amplificación del marcador mitocondrial (COI)

Después de realizar varios experimentos, se creó e implementó un protocolo para el proceso de amplificación del fragmento COI mediante la estandarización de las concentraciones idóneas para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 6) y la optimización de las condiciones de termociclado (Tabla 7 y 8).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 6. Características de los reactivos empleados en la PCR.

Volumen (µl)	Reactivos/Concentración/ Marca
6.10	ddH ₂ O
2.00	Buffer PCR/10X/PROMEGA
1.10	dNTP's/10 Mm/PROMEGA
0.75	Cebador foward/10µm/MACROGEN
0.50	Cebador reverse/10µm/MACROGEN
0.50	BSA/20mg/mL/SIGMA
0.10	Taq polimerasa/U/PROMEGA
0.5 a 1.5	ADN/variable

Tabla 7. Condiciones de termociclado.

Etapas	Tiempo y temperatura	Número de ciclos
Inicio	3 min. a 94°C	1
Desnaturalización	1 min. a 94°C	
Alineamiento	1 min. a la temperatura óptima (42 a 52°C)	40
Elongación de la cadena	1 min a 72°C	
Elongación final	8 min a 72°C	1
Conservación	4.0°C a ∞	-

Tabla 8. Temperatura de los cebadores.

Cebador		Temperatura °C
Foward	Reverse	
Tun-F	Tun-R	42
Urocho_F	Urocho_R	49
dgHCO	dgLCO	42 a 52

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Se obtuvieron resultados positivos pertenecientes a cuatro individuos, los cuales estuvieron representados por la presencia de bandas de buena calidad en los geles de verificación (Ilustración 36).

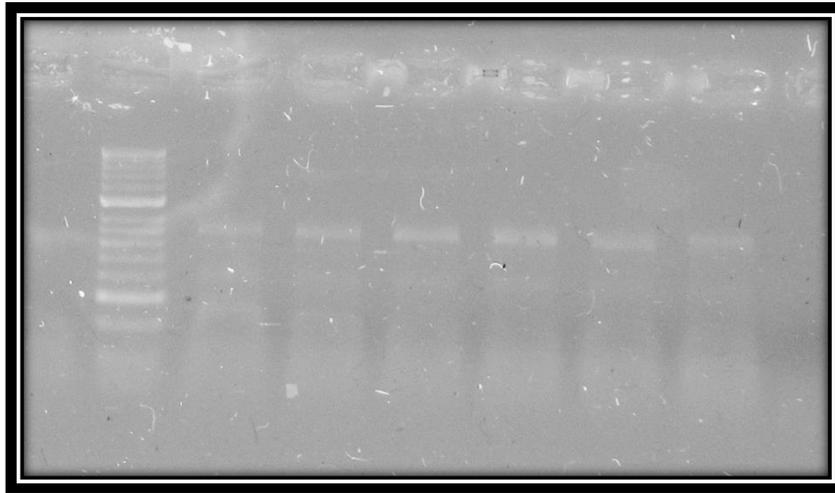


Ilustración 32. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la concentración de productos PCR obtenidos de la amplificación del fragmento del gen COI.

Derivado de lo anterior, el porcentaje de éxito de la PCR con los cebadores empleados en este proyecto fue del 25%, es decir, de 120 pruebas de PCR's realizadas, se logró obtener 30 resultados positivos, que al ser unidos para su purificación, les correspondieron a 16 individuos (Tabla 9).

7.2.3 Análisis de las secuencias

En total, fueron secuenciados 16 productos de PCR, de los cuales se obtuvieron secuencias de nueve individuos (en total 18, tanto forward como reverse), de aproximadamente 650 pb, todas ellas de buena calidad (Ilustración 33), las cuales al ser analizadas les corresponden a cuatro especies.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

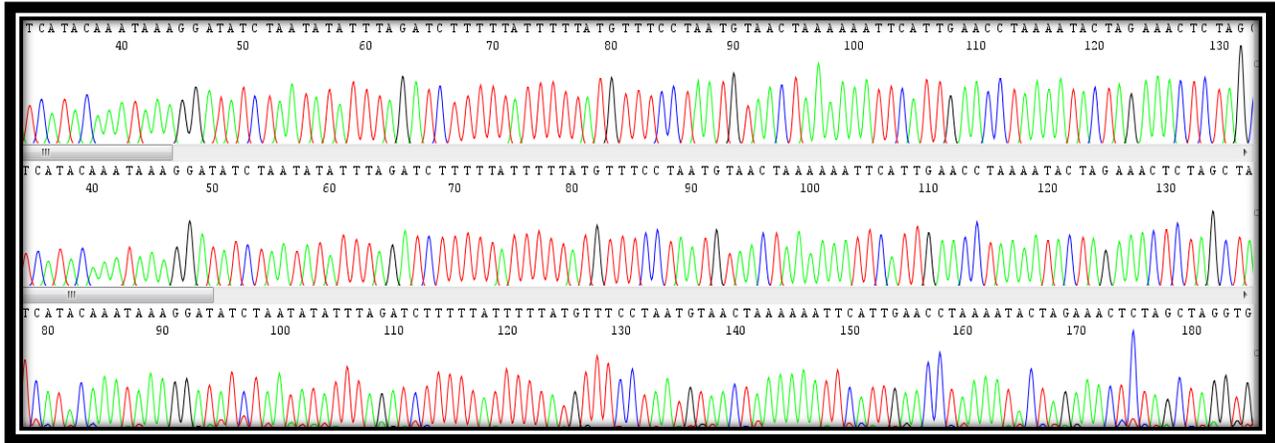


Ilustración 33. Cromatograma de la secuencias de ADN de *Cystodytes aff. lobatus*.

Se realizó un análisis de las secuencias, el cual consistió en el rastreo de las secuencias obtenidas en este trabajo, a través del programa BLAST® de GenBank, el cual proporcionó un porcentaje de similitud de entre 80% y 86% de parentesco con especies afines incorporadas en la base de datos (Tabla 9).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 9. Resultados moleculares simplificados.

Código	Especie	Cebador utilizado	Pb	Blast GenBank	% de parentesco	Código de acceso
SEM-TUN-264	<i>Cystodytes</i> aff. <i>lobatus</i>	TUN-F y TUN-R	604	<i>Cystodytes</i> <i>dellechiajei</i>	87	AY523044.1
SEM-TUN-265	<i>Cystodytes</i> aff. <i>lobatus</i>	TUN-F y TUN-R	604	<i>Cystodytes</i> <i>dellechiajei</i>	87	AY523044.1
SEM-TUN-266	<i>Trididemnum</i> <i>savignii</i>	TUN-R Y TUN-R	600	<i>Cystodytes</i> <i>dellechiajei</i>	83	AY523044.1
SEM-TUN-267	<i>Trididemnum</i> <i>savignii</i>	TUN-R Y TUN-R	600	<i>Cystodytes</i> <i>dellechiajei</i>	83	AY523044.1
SEM-TUN-253	<i>Microcosmus</i> <i>exasperatus</i>	TUN-F y TUN-R	621	<i>Microcosmus</i> <i>squamiger</i>	83	EU486404.1
SEM-TUN-352	<i>Didemnum</i> <i>vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	730	<i>Nitratireductor</i> sp.	86	CP029208.1
SEM-TUN-353	<i>Didemnum</i> <i>vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	710	<i>Nitratireductor</i> sp.	85	CP029208.1
SEM-TUN-359	<i>Didemnum</i> <i>vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	590	<i>Sulfitalea</i> <i>hydrogenivorans</i>	80	AP012547.1
SEM-TUN-377	<i>Didemnum</i> <i>vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	580	Sin parentesco	0	-
SEM-TUN-378	<i>Didemnum</i> sp.	Urocho-F y Urocho-R	640	Sin parentesco	0	-
SEM-TUN-383	<i>Didemnum</i> <i>vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	710	<i>Polymorphum</i> <i>qilvum</i>	81	CP002568.1
SEM-TUN-386	<i>Didemnum</i>	Urocho-F y Urocho-R	640	<i>Didemnum</i> <i>candidum</i>	84	AY116602.1
SEM-TUN-404	<i>Didemnum</i> <i>vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	650	<i>Polymorphum</i> <i>qilvum</i>	85	CP002568.1
SEM-TUN-405	<i>Didemnum</i> <i>vanderhorsti</i>	dgHCO y dgLCO	710	<i>Didemnum</i> <i>candidum</i>	82	AY116602.1

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

SEM-TUN-408	<i>Didemnum vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	720	<i>Didemnum candidum</i>	83	AY116602.1
SEM-TUN-409	<i>Didemnum vanderhorsti</i>	Urocho-F y Urocho-R	650	<i>Didemnum candidum</i>	84	AY116602.1

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

7.2.4 Alineamiento y análisis del locus mitocondrial (COI)

Se alinearon 167 secuencias pertenecientes a la clase Ascidiacea, todas ellas de entre 600 y 750 pb, de las cuales nueve derivaron de este estudio y el resto de la base de datos de GenBank. Adicionalmente, se incorporó una secuencia de *Thalia longicauda* perteneciente a la clase Thaliacea. Después de alinear las secuencias y eliminar los extremos, el tamaño final del alineamiento fue de 418 pb, del cual se obtuvieron 83 de sitios conservados, 281 sitios variables, de los cuales 266 son sitios parsimoniosamente informativos (Ilustración 35).

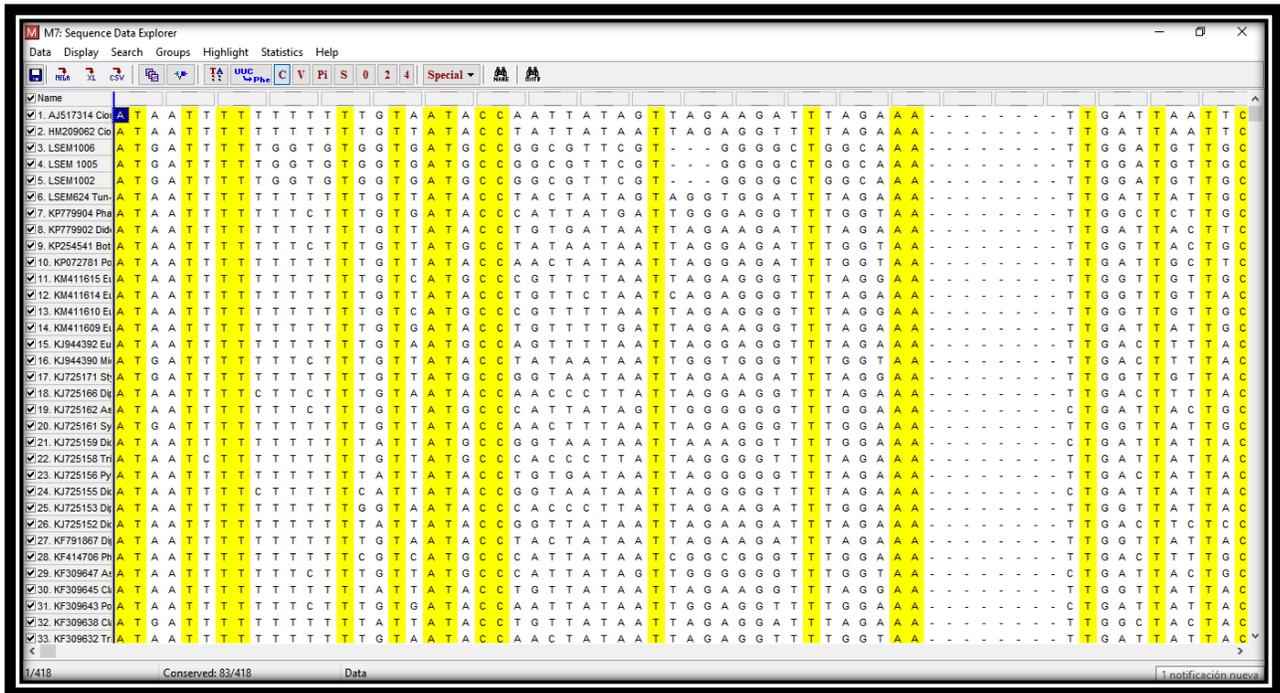


Ilustración 34. Alineamiento de las secuencias: Sitios conservados.

7.2.5 Análisis filogenético

El árbol filogenético mostró cinco agrupaciones principales (Ilustración 36), pertenecientes a los tres órdenes en los cuales se divide la clase Ascidiacea (Aplousobranchia, Phlebobranchia y Stolidobranchia).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

El clado mejor representado y constituido como grupo parafilético fue el orden Stolidobranchia, en donde se encontraron a las familias: Molgulidae (compartiendo clado con el orden Aplousobranchia), Pyuridae y Styelidae (en un mismo clado). Mientras que los órdenes Aplousobranchia y Phlebobranchia se encontraron compartiendo taxones constituyéndose, como grupos polifiléticos. En el primero (Aplousobranchia) se encontró representado por las familias: Polyclinidae, Polycitoridae, Diazonidae, Clavellinidae y Didemnidae, esta última es la más abundante en el análisis. En el segundo (Phlebobranchia) se encontraron las familias: Ascidiidae (compartiendo clado con el orden Aplousobranchia), Corellidae y Cionidae (en un mismo clado). Por último, en el grupo de los Stolidobranchia.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Derivado del análisis filogenético, se pudo ubicar afinidades para las secuencias de este estudio en secuencias de taxones cercanos (géneros y especies) obtenidas de GenBank. En este sentido, se observaron cuatro agrupaciones principales de interés (G1, G2, G3 y G4) que se muestran a continuación:

La agrupación G1 (Ilustración 37), está constituida por las secuencias del género *Cystodytes*, con un valor bootstrap del 17% y un valor de distancia genética promedio de 0.525. En este clado quedó ubicada la secuencia de *Cystodytes* aff. *lobatus* de este estudio, con un valor de distancia genética mínimo de 0.005 que se encontró al compararla con la de *Cystodytes aucklandicus* (GenBank) y que indicaría una cercanía evolutiva considerable, mucho mayor que con las demás especies del mismo género (Tabla 10).

En el clado G2 (Ilustración 37) se encuentran agrupadas todas las secuencias del género *Trididemnum* (bootstrap=24%) con un valor promedio de distancia genética de 0.210 incluyendo la secuencia de *Trididemnum savignii* (de este estudio). Las distancias genéticas estimadas en comparaciones pareadas dentro del clado indican que la especie más cercana a nuestra secuencia fue *Trididemnum cerum* con una distancia genética de 0.193 (Tabla 11).

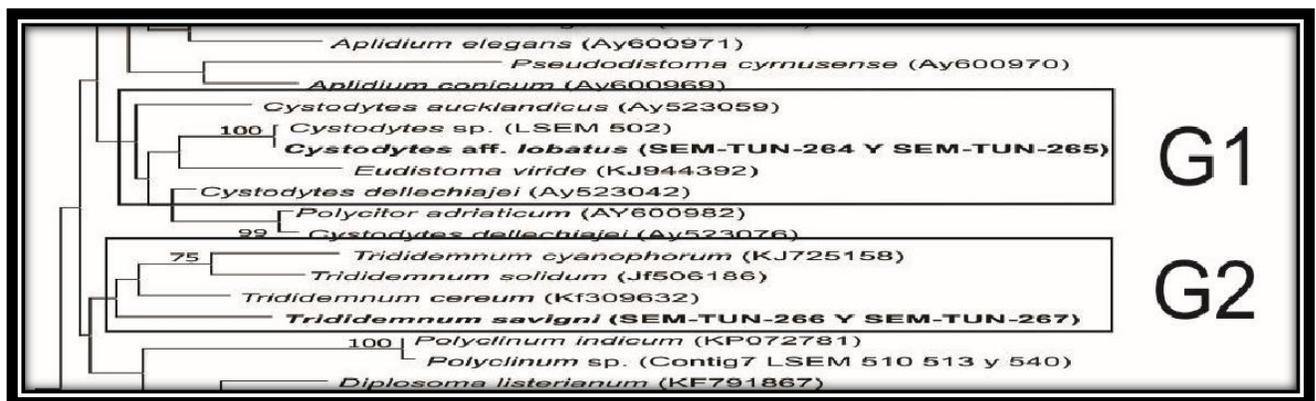


Ilustración 36. Representación filogenética de las agrupaciones G1 y G2.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 10. Distancias genéticas entre las especies del género *Cystodytes* (agrupación G1).

Especies	1	2	3	4	5
<i>Cystodytes aucklandicus</i>					
<i>Cystodytes dellechiaiei</i>	0.374				
<i>Cystodytes dellechiaiei</i>	0.642	0.346			
<i>Cystodytes</i> sp.	0.770	0.405	0.758		
* <i>Cystodytes</i> aff. <i>lobatus</i>	0.786	0.417	0.743	0.005	

*Secuencia obtenida en el presente estudio.

Tabla 11. Distancias genéticas entre las especies del género *Trididemnum* (agrupación G2).

Especies	1	2	3	4
<i>Trididemnum cerum</i>				
<i>Trididemnum cyanophorum</i>	0.209			
* <i>Trididemnum savigni</i>	0.193	0.273		
<i>Trididemnum solidum</i>	0.199	0.166	0.218	

*Secuencia obtenida en el presente estudio.

El clado G3 (Ilustración 38), agrupó la secuencia de *Microcosmus exasperatus*, obtenida en este estudio con un valor bootstrap del 80% y de distancia genética de 0.304 respecto a su congénere *M. squamiger*.

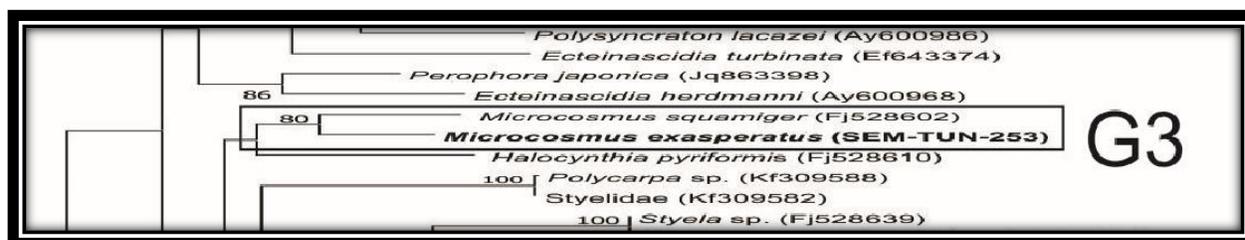


Ilustración 37. Representación filogenética de la agrupación G3.

El género *Didemnum* se caracterizó por presentar dos grandes agrupaciones (clados distintos) dentro del análisis filogenético. La agrupación de interés fue nombrada como G4, en dicho clado se agruparon las secuencias de *Didemnum* aff. *recurvatum*

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

obtenidas en este estudio con las secuencias de *Didemnum candidum*, con un valor bootstrap del 100% y un valor promedio de distancia genética entre las secuencias de 0.116 (Tabla 12). Mientras que el valor de distancia genética entre las dos agrupaciones formadas por el género *Didemnum* fue de 0.762.



Ilustración 38. Representación filogenética de la agrupación G4.

Tabla 12. Distancias genéticas entre las especies del género *Didemnum* (agrupación G4).

Especies	1	2	3	4	5
<i>Didemnum candidum</i>					
<i>Didemnum candidum</i>	0.036				
<i>Didemnum candidum</i>	0.015	0.052			
* <i>Didemnum vanderhorsti</i>	0.172	0.183	0.169		
* <i>Didemnum vanderhorsti</i>	0.184	0.192	0.180	0.021	
* <i>Didemnum vanderhorsti</i>	0.168	0.179	0.165	0.003	0.018

*Secuencias obtenidas en el presente estudio.

En cuanto a la relación entre los diferentes grupos (G1, G2, G3 y G4), se obtuvo una matriz de distancias (Tabla 13) con valores mínimos de 0.234 y máximos de 0.531, que en promedio se tiene una distancia genética de 0.442 entre los diferentes géneros (*Trididemnum*, *Didemnum*, *Cystodytes* y *Microcosmus*).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 13. Distancias genéticas entre géneros.

Especies	1	2	3	4
<i>Trididemnum</i>				
<i>Didemnum</i>	0.515			
<i>Cystodytes</i>	0.234	0.501		
<i>Microcosmus</i>	0.445	0.531	0.429	

VIII. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Taxonómicas

En este apartado se abordan temas relacionados con los criterios empleados en la identificación de los ejemplares examinados, la problemática que esto conlleva y aspectos generales sobre la biodiversidad del grupo, con énfasis en la zona de estudio (Pacífico mexicano). En cuanto a los criterios empleados para discernir entre orden, familia y géneros se consultó la literatura de diferentes especialistas en taxonomía (Van Name, 1945; Monniot y Lambert, 2008; Monniot, *et al.*, 1991; Rocha, *et al.*, 2012), que de acuerdo a ellos, mencionan que en general, los miembros de la clase Ascidiacea comparten ciertas características como, por ejemplo: lóbulos (orales y atriales), estigmas, tentáculos orales, entre otros, los cuales pueden variar en número y dimensión, pero existen ciertos caracteres que son diagnósticos para identificar las especies.

En el orden Phlebobranchia, se identificaron cuatro familias: Diazonidae, Didemnidae, Polycitoridae y Polyclinidae, los cuales se pueden diferenciar entre ellos, por las características mostradas en la tabla 14.

Tabla 14. Comparación entre cuatro familias del orden Phlebobranchia: Diazonidae, Didemnidae, Polycitoridae y Polyclinidae.

Familia	Diazonidae	Didemnidae	Polycitoridae	Polyclinidae
Características	Saco branquial con muchas filas de estigmas, papilas en los vasos longitudinales y lámina	Colonias planas e incrustantes, zooides pequeños	Sifones con aberturas independientes, muscultura muy pronunciada	Sifón oral lobulado y atrial sin lóbulos, puede presentar o no una lengüeta

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

dorsal con
lengüetas

Respecto a la familia Diazonidae, se identificaron especies pertenecientes al género *Diazona* y *Rhopalaea*, los cuales se diferencian por las características mostradas en la tabla 15.

Tabla 15. Comparación entre dos géneros de la familia Diazonidae: *Diazona* y *Rhopalaea*.

Géneros	<i>Diazona</i>	<i>Rhopalaea</i>
Colonias	Grandes y masivas	Pequeños grupos
Zooides	Pequeños	Grandes
Túnica	El estómago se encuentra muy incrustados a la túnica que lo rodea	Estómago ligeramente incrustado a la túnica

En cuanto a la familia Didemnidae, se encontraron especies representantes del género *Didemnum* y *Trididemnum*, dichos géneros se diferencian entre sí por las siguientes características: el género *Didemnum* posee cuatro filas de estigmas y una abertura auricular simple y/o con lengüeta, mientras que, el género *Trididemnum* posee tres filas de estigmas y una abertura auricular simple.

Mientras que, la familia Polycitoridae se encontró representada por los géneros *Eudistoma* y *Cystodytes*, que se diferencian por las características mostradas en la tabla 16.

Tabla 16. Comparación entre dos géneros correspondientes a la familia Polycitoridae: *Eudistoma* y *Cystodytes*.

Géneros	<i>Eudistoma</i>	<i>Cystodytes</i>
Espículas	Ausentes	Presentes en forma de disco

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Zooides	Alargados y estirados	Cortos y compactos
Faringe	Más de 4 hileras de estigmas	4 hileras de estigmas
Estómago	Alargado	Redondeado
Células de vejiga	Ausentes	Abundantes

Por último, el único género representante de la familia Polyclinidae fue *Aplidium*, que se caracteriza por poseer zooides robustos, con pocas filas de estigmas y abdomen corto.

Del orden Phlebobranchia se encontró la familia Ascidiidae como única representante caracterizada por lo siguiente: ser solitarias, con túnica traslúcida, el saco branquial presenta musculatura en el lado derecho, el intestino generalmente alargado y rodeando el ovario. En dicha familia se encontraron representantes del género: *Ascidia*, *Ascidiidae* y *Phallusia*, que se diferencian por las características mostradas en la tabla 17.

Tabla 17. Comparación entre tres géneros correspondientes a la familia Ascidiidae: *Ascidia*, *Ascidiella* y *Phallusia*.

Género	<i>Ascidia</i>	<i>Molgula</i>	<i>Phallusia</i>
Características	Conducto neuronal con una sola apertura en el tubérculo dorsal	Son más pequeñas y como carácter diferencial tienen los dos sifones en la parte apical del cuerpo,	Conducto neuronal con muchas aperturas además del que está en el tubérculo dorsal

En este estudio se encontraron dos familias pertenecientes al orden Stolidobranchia: Styelidae y Pyuridae, que se diferencian por las características mostradas en la tabla 18.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Tabla 18. Comparación entre dos familias pertenecientes al orden Stolidobrancha: Styelidae y Pyuridae.

Familia	Styelidae	Pyuridae
Organización	Solitaria o colonial	Solitario
Musculatura	Ligeramente pronunciada	Muy marcada
Sifones	cuadrados	Cuadrados
Tentáculos	Simple	Ramificados
Pliegues	4 en cada lado	De 6 a 10

Dentro de la familia Styelidae, se identificaron especies de cuatro géneros: *Styela*, *Pyura*, *Microcosmus* y *Metandrocarpa*, que se diferencian por las características mostradas en la tabla 19.

Tabla 19. Comparación entre cuatro géneros pertenecientes a la familia Styelidae: *Styela*, *Pyura*, *Microcosmus* y *Metandrocarpa*.

Género	<i>Styela</i>	<i>Pyura</i>	<i>Microcosmus</i>	<i>Metandrocarpa</i>
Sifones	Variable	Cortos	Largos	Cortos
Lámina dorsal	Lisa	Lengüetas	Membrana	Lisa
Gónadas	Envueltas en membrana y ovario tubular	Lobuladas	Con 5 lóbulos	Lobuladas

8.1.2 Problemática en la taxonomía de la clase Ascidiacea

La clase Ascidiacea presenta una alta dificultad en lo que respecta a la clasificación taxonómica de las especies, debido principalmente a la complejidad en la manipulación e interpretación de las características morfológicas empleadas para su identificación. Uno de los puntos que se ha sugerido como clave para la identificación de las especies es una buena preservación de los organismos basada en diferentes

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

metodologías previas y post-fijación de los individuos. Esto con la finalidad de conservar de manera adecuada las estructuras corporales (Van Name, 1945; Monniot *et al.*, 1991; Monniot & Monniot, 1996; Bonnet & Rocha, 2013). En este trabajo se presentó gran dificultad en la revisión de algunos de los ejemplares (recolectados previamente al estudio) principalmente atribuido a la problemática de la fijación.

Otro aspecto que algunos autores han sugerido de manera auxiliar es la realización de fichas que contengan la información del organismo en vida (ej. Palomino, 2017), también la toma de fotografías *in situ* (Rocha *et al.*, 2012), con la finalidad de facilitar la identificación de los especímenes. Es de mencionar que para este estudio no se contó con imágenes o fichas de los ejemplares recolectados previos al estudio, pero si de los obtenidos durante esta investigación, lo que sirvió de referencia para comparar y facilitar la identificación de los ejemplares con otros reportados para la costa del Pacífico y otras partes del mundo.

En cuanto a la identificación de ascidias, esta actividad es menos compleja en individuos solitarios, esto asociado principalmente a su tamaño, lo que le confiere mayor facilidad en la manipulación e interpretación de sus estructuras. Mientras que en ascidias coloniales, la fragilidad de sus estructuras corporales y su tamaño se convierte en un problema, debido a que alcanzan escasos centímetros de longitud. Debido a esto se han sugerido otras metodologías, que consisten en la identificación a través de su estado larvario (Monniot y Lambert, 2008) y la observación de sus espículas (Turon, 1986). La primera metodología es compleja debido a que la identificación dependerá de su estado de madurez y de su época reproductiva, que a pesar de ser poco conocida, difiere entre grupos (Brusca y Brusca, 2003; Monniot y Lambert, 2008). Ante tal situación, fue poco práctico tomar como criterio de referencia la morfología de las larvas, ya que solo en algunos de los ejemplares estudiados se encontraron presentes. Además, otro inconveniente con el uso de esta metodología es que las descripciones de muchas especies son antiguas y no hacen referencia a esta característica. Por lo que, en la mayoría de los casos no fue posible comparar la larva con lo registrado en la literatura.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

En el caso particular de la familia Didemnidae, Turón (1986) sugirió que si se examina un número suficiente de espículas y se realiza un recuento de los radios se podría llegar al mínimo nivel taxonómico (especie). Desafortunadamente no se ha logrado la identificación de especies a través de esta propuesta, debido a que muy pocos autores han seguido este procedimiento. Sin embargo, es de reconocer la necesidad de dar mayor importancia a estos caracteres, con la finalidad de comprobar si realmente pueden ser diagnósticos en la discriminación de especies. Para lo cual es recomendando principalmente el uso de microscopio electrónico de barrido para una mejor resolución de estas estructuras.

Además, en los géneros *Didemnum*, *Cystodytes* y *Eudistoma*, se detectó una importante variabilidad morfológica intraespecífica en los zooides. Esto al parecer derivado de la alta plasticidad fenotípica de los individuos de algunas especies, lo que conlleva a un problema mayor para la correcta identificación de las especies. El problema deriva en que muchas de las descripciones de especies conocidas solo se centran en la revisión de uno o dos individuos (zooides) (Van Name, 1945), dejando muy grande el margen de error al no tomar en cuenta otros fenotipos de la misma colonia. Para evitar esto, se tendrían que tomar en cuenta la morfología de un mayor número de zooides con la finalidad de generar una diagnosis más completa de las especies.

Probablemente el mayor problema para el estudio de las Ascidias del Pacífico mexicano (y en general del Pacífico oriental) es la escasa literatura existente (véase antecedentes), lo que dificulta la identificación de las especies hasta el mínimo nivel taxonómico. La poca literatura que hay es muy ambigua y poco descriptiva, dejando muy grande el margen de identificación. Como consecuencia de esta poca información podemos resaltar el incremento significativo de nuevos registros y la probable presencia de nuevas especies en nuestras costas.

8.3 Biodiversidad de la clase Ascidiacea en el Pacífico mexicano

La clase Ascidiacea constituye un grupo altamente biodiverso con aproximadamente 2800 especies registradas a nivel mundial, de esta cifra solo 40 pertenecen a costas del Pacífico mexicano (véase antecedentes). Si bien, las características del área geográfica (tipo de sustrato, alimento, competencia, depredación etc.) son de suma importancia para la diversidad de especies, es más probable que el bajo número de registros se deba más bien a la falta de estudios en el área.

En este trabajo se encontraron representantes de los 3 órdenes de Ascidiacea. El orden mejor representado fue Aplousobranchia (72% equivalente a 76 especies), seguido del Stolidobranchia (16% equivalente a 17 especies) y en último lugar el Phlebobranchia (12% equivalente a 13 especies). Esta información es acorde con lo esperado para los tres órdenes debido a que en general las proporciones son similares al estudio realizado por Shenkar y Swalla (2011), en donde también el orden más diverso es el Aplousobranchia con 1480 especies (Ilustración 40).

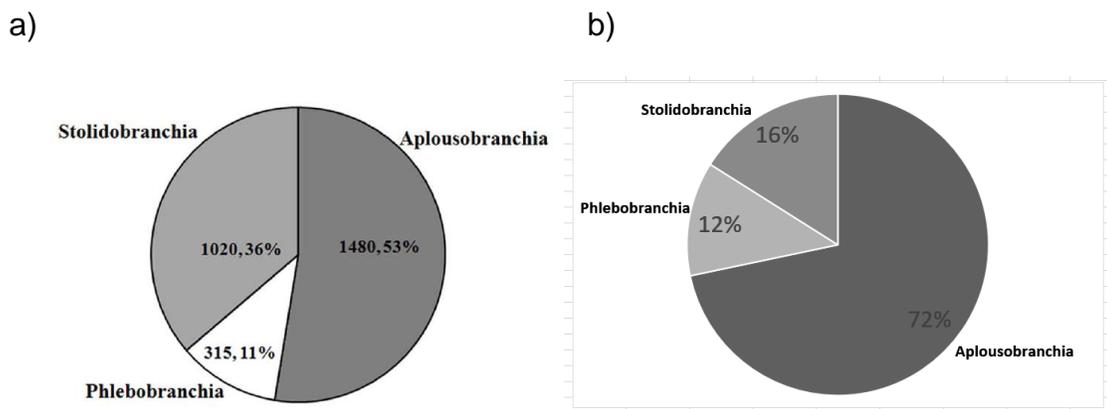


Ilustración 39. Porcentaje de especies por orden: a) Tomado de Shenkar y Swalla (2011); b) Presente estudio.

En cuanto al número de familias, se identificaron siete, la mejor representada fue la Didemnidae (Ilustración 41), fue muy abundante y frecuente, ya que se observó en todos los sitios muestreados, lo cual coincide perfectamente con el estudio de Shenkar

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

y Swalla (2011) (Ilustración 42), en donde enfatizan que esta familia es de las más diversas a nivel mundial. Su alta frecuencia se puede deber a su cosmopolitismo (Stefaniak *et al.*, 2009), aunado a las ventajas que le ofrecen las condiciones ambientales como: la disponibilidad del alimento, pero principalmente por la poca profundidad y la presencia de luz (Iturralde, 1996), como es el caso de los ecosistemas coralinos donde fueron encontradas.

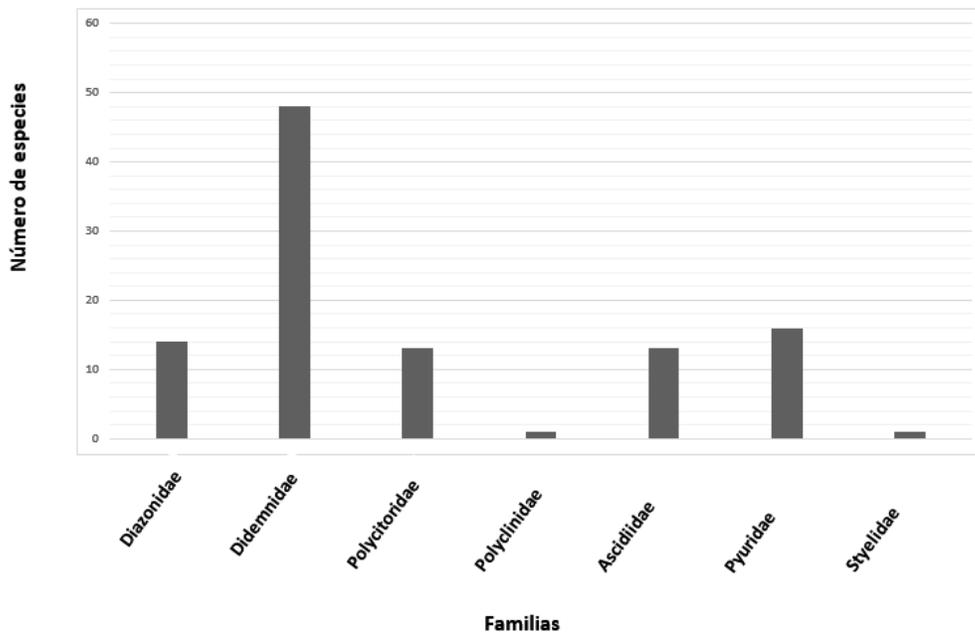


Ilustración 40. Número de especies por familia (presente estudio).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

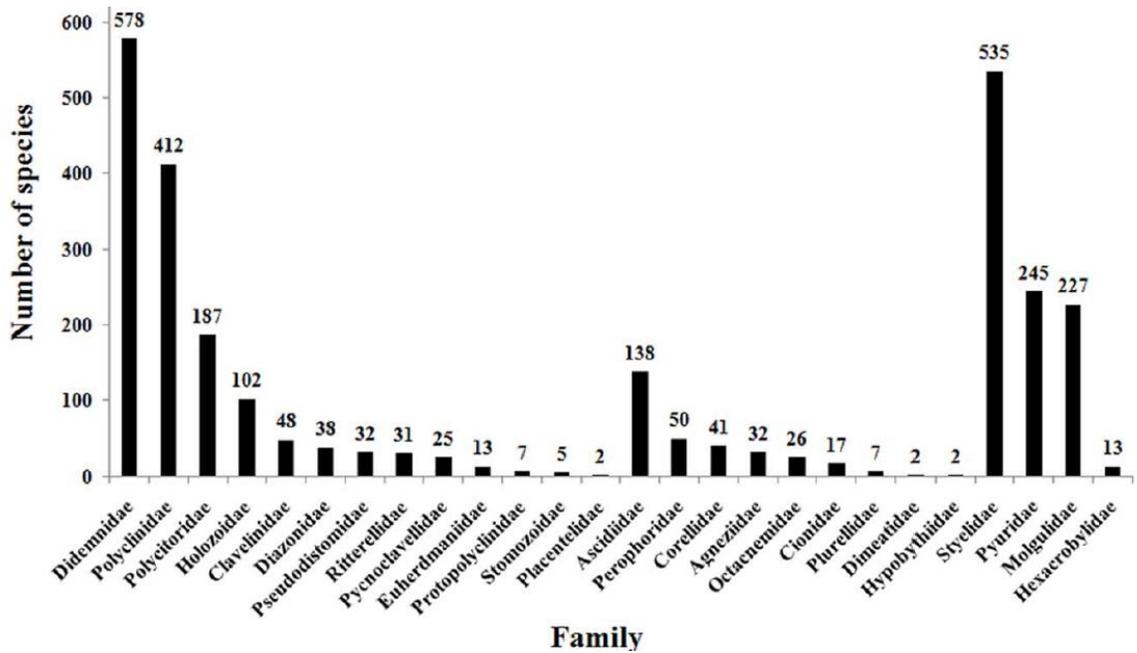


Ilustración 41. Número de especies por familia (Shenkar y Swalla, 2011).

En cuanto al número de géneros, fueron identificados 13 (Ilustración 47), el mejor representado fue *Didemnum*, con una mayor diversidad de especies, su carácter cosmopolita les ofrece mayores ventajas respecto a otros géneros. Seguido del género *Rhopalaea*, el cual se caracteriza por ser de ambientes coralinos, su carácter regenerativo le ofrece muchas ventajas para su subsistencia en sustratos duros, ya que al ser víctimas de depredación o desprendimiento forzado, el estómago suele quedar adherido al sustrato, lo cual le ofrece beneficios para su pronta regeneración y así poder permanecer por bastante tiempo en estos sitios (Shenkar *et al.*, 2016).

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

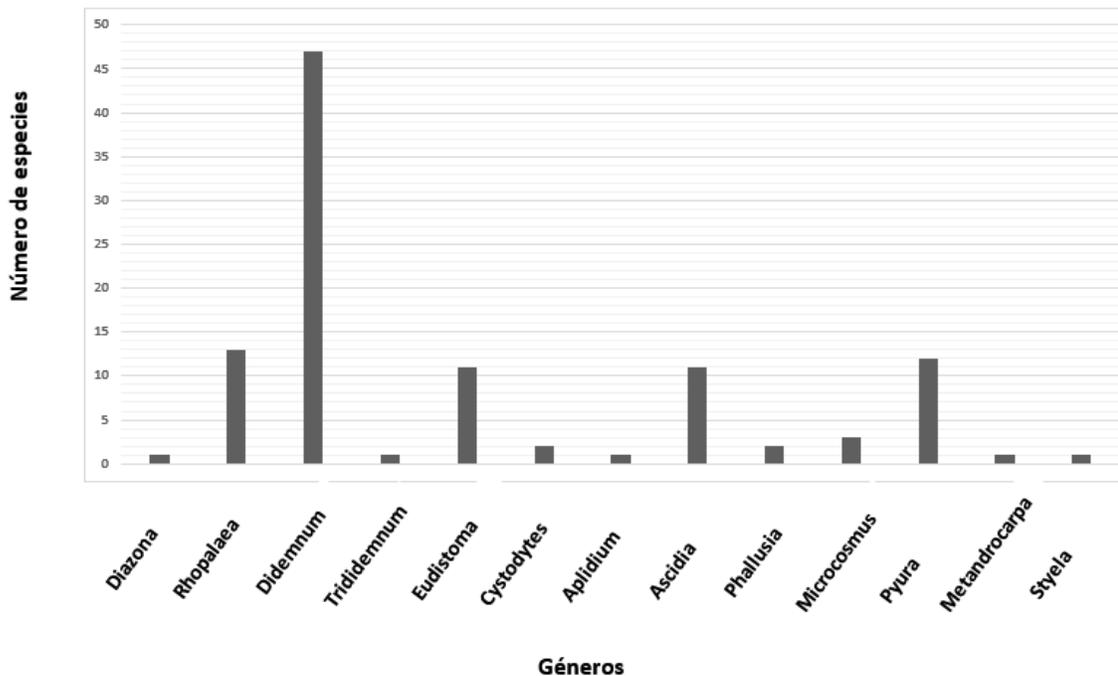


Ilustración 42. Número de especies por género (presente estudio).

En cuanto al número de especies, se identificaron 27, de las cuales: 12 fueron nuevos registros para las costas del Pacífico Oriental Tropical (*Diazona* aff. *carcosa*, *Eudistoma* sp.1, *Eudistoma* sp.2, *Eudistoma* sp.3, *Eudistoma* sp.4, *Didemnum* sp., *Rhopalaea abdominalis*, *Pyura squamulosa*, *Pyura stolonifera*, *Pyura* sp., *Phallusia nigra* y *Phallusia mammillata*) y cuatro para las costas del Pacífico mexicano (*Cystodytes* aff. *lobatus*, *Aplidium* sp., *Ascidia liberata* y *Metandrocarpa* aff. *michaelsen*).

De la literatura, uno de los arrecifes coralinos mejor estudiados en cuanto a la diversidad de ascidias es en Nueva Caledonia (Monniot *et al.*, 1991). Donde al comparar la riqueza de familias con respecto a este estudio es muy similar (13 en ambos casos). Sin embargo, difieren en el número de géneros, debido a que en Nueva caledonia se supera 5 veces el número de géneros (~136 géneros) respecto al presente estudio. La diferencia puede estar atribuida principalmente a que los arrecifes de Nueva Caledonia ha sido relativamente bien estudiada y en ese sitio se encuentran dos expertos mundiales en el conocimiento taxonómico de ascidias. Mientras que en el Pacífico mexicano hace falta más estudios al respecto.

8.2 Moleculares

En esta sección se abordan los aspectos relacionados con los procesos de estandarización de protocolos de extracción y amplificación de ADN de la clase Ascidiacea, así como también se enfatizan aspectos de la sistemática molecular del grupo.

8.2.1 Estandarización de los protocolos empleados para el análisis molecular

La amplificación de fragmentos de ADN en ascidias se ha visto marcada por el uso frecuente del marcador mitocondrial COI, tanto para estudios sistemáticos como poblacionales. A pesar de su uso, se puede decir que aún se han desarrollado muy pocos cebadores específicos para la amplificación de loci en tunicados, incluso se desconoce la variabilidad que puedan tener otros fragmentes (comúnmente usados en otros grupos) para su aplicación en sistemática de los Ascidiacea. En este trabajo solo se emplearon tres juegos de cebadores representados por los dgLCO1490 y dgHCO2198 (Meyer, *et al.*, 2005), Tun-F y Tun-R (Stefaniak *et al.*, 2009) y Urocho-F y Urocho-R. Todos ellos amplificaron el mismo fragmento de ‘COI’ de especies coloniales (principalmente de la familia Didemnidae). Los que mejores resultados dieron fueron los cebadores Tun-F y Tun-R, ya que además se aplicaron individuos solitarios (género *Microcosmus*), su efectividad comparada con los dgLCO1490 y dgHCO2198 y los Urocho-F y Urocho-R, se debe principalmente a que fueron diseñados específicamente para la clase Ascidiacea, mientras que los otros (dgLCO1490 y dgHCO2198 y los Urocho-F y Urocho-R) han sido empleados en todo tipo de invertebrados.

8.2.3 Códigos de barras de ADN

El código de barras de ADN fue propuesto con la finalidad de proporcionar un marcador molecular estándar, que permita identificar y discernir de forma confiable entre las especies. Sin embargo, a lo largo de su implementación se ha demostrado que especies de diferentes grupos presentan porcentajes de divergencia distintos, es decir que las tasas de evolución molecular mitocondrial (en este caso del gen COI) no son las mismas entre todos los grupos de especies. Debido a lo anterior, se ha debatido sobre

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

la importancia y eficiencia de los códigos de barra y el grado de divergencia que debe establecerse para estandarizar los criterios para diferenciar entre especies (Hebert *et al.*, 2003; Griggio *et al.*, 2014). En algunos grupos como los metazoarios inferiores, el fragmento es muy poco variable (Cruz-Barraza *et al.*, 2012). Mientras que, para otros grupos de organismos superiores, es funcional para estudios a nivel poblacional debido a la diversidad haplotípica que puede presentar en una misma especie (Griggio *et al.*, 2014). A pesar de lo anterior, el gen COI es ampliamente utilizado por diversos autores (ej. Kumaran *et al.*, 2013; Iyappan *et al.*, 2016). En el caso particular de las secuencias de ascidias obtenidas en el presente estudio, el código de barras fue eficiente para discriminar al menos hasta género, presentando porcentajes de parentesco que oscilan entre el 81 y 87%, confirmando así la congruencia de las secuencias obtenidas con las incorporadas en la base de datos de GenBANK. Sin embargo, es necesario la secuenciación de un mayor número de especies de la clase Ascidiacea, para definir con claridad el porcentaje de divergencia entre ellas y una identificación más precisa.

En el caso particular de la especie *Didemnum vanderholti*, se puede apreciar que, en la identificación molecular, algunas secuencias mostraron porcentaje de parentesco del 84% con especies afines (*Didemnum candidum*) y otras con 85% de parentesco, el cual se encuentra relacionado con bacterias (*Nitroreductor* sp. y *Polymorphum gilvum*). Esta relación, se puede atribuir a la eficacia de los cebadores (Urocho-F y Urocho-R), para amplificar simbiontes presentes en las ascidias.

Por otra parte, se logró amplificar la especie *Didemnum* sp., la cual al ser sometida al análisis BLAST, no mostró relación con ninguna secuencia inmersa en la base de datos, ante tal situación, la secuencia quedó fuera del análisis filogenético.

En general, se obtuvieron cuatro nuevos códigos de barras de ADN pertenecientes a las siguientes especies: *Cystodytes* aff. *lobatus*, *Trididemnum savignii*, *Microcosmus exasperatus*, *Didemnum vanderhorsti* y *Didemnum* sp.

8.2.4 Sistemática molecular del grupo

Basándose en el único estudio que aborda la filogenia molecular de la clase Ascidiacea, se puede apreciar que, en el análisis realizado por Turón y López (2004), los tres órdenes aparecen bien diferenciados, en donde Aplousobranchia y Stolidobranchia se encuentran separadas en clados distintos generalmente con buen soporte por sus valores de bootstrap, tal situación es contraria a este estudio, debido a que el orden Phlebobranchia presenta los valores de bootstrap más altos. Esta diferencia puede estar relacionada con que Turón y López incorporaron un bajo número de especies en su estudio. Así mismo Turón y López (2004) mencionan la parafilia de Phlebobranchia, lo cual se pudo reafirmar en el análisis.

Como ya se mencionó en los resultados, las secuencias obtenidas en este estudio se agruparon con especies afines al género, derivado de ello se formaron 4 agrupaciones, todas ellas con valores Bootstrap que oscilan entre 72 y 100%.

En la agrupación G1 y G2, se encuentran los géneros *Cystodytes* (valor bootstrap del clado del 17%) y *Trididemnum* (valor bootstrap del clado del 22%), unidos al mismo clado con un valor Bootstrap muy bajo. Ambos pertenecientes a la clase Aplousobranchia, lo cual coincide con el estudio de Turon & López (2004), donde claramente se aprecia esta misma agrupación de la familia Didemnidae y Polycitoridae. Sin embargo, el clado no es monofilético, ya que, no se encuentran incluidos todos los representantes de la familia Didemnidae, el resto de los géneros quedan fuera de la agrupación.

En la agrupación G3 se encuentra la especie *Microcosmus exasperatus*, relacionada con géneros afines, formando un clado con un valor bootstrap del 80%. Sin embargo, en la agrupación no se encuentran todos los representantes del género, ya que algunas especies quedan fuera o emparentadas en otros grupos. El género *Microcosmus* pertenece a la familia Pyuridae, la cual se encontró relacionada con la familia Styelidae, dicha agrupación de clados coincide con el análisis realizado por Turon

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

y López (2004), en donde se observó el mismo patrón. De lo cual se puede inferir que ambas familias son grupos hermanos.

En cuanto a la agrupación G4 se encuentra la especie *Didemnum vanderhorsti*, la cual se encontró agrupada con especies a fines (*Didemnum candidum*) con un valor de soporte para la separación del grupo del 100%. Las secuencias correspondientes al género *Didemnum* fueron las más diversas de la familia Didemnidae, de ellas se pudieron observar dos agrupaciones: la primera agrupación, pertenece al orden Aplousobranchia y contiene el mayor número de especies cuyas identidades en un mismo clado son soportadas con un Bootstrap del 82%. De este género se han realizado diferentes análisis filogenéticos, en los cuales confirman su agrupación molecular (ej. Stefaniak *et al.*, 2009; Kumaran *et al.*, 2013). Sin embargo, la segunda agrupación del género se encontró relacionada con el orden Phlebobranchia, lo cual, se contrapone al estudio realizado por Turón y López (2004) y Moreno y Rocha (2008), quienes mencionan que la familia Didemninae es la más estable al realizar cladogramas.

Por otra parte, la agrupación G4 coincide con el estudio realizado por Iyappan *et al.*, (2016), en donde se observó una relación entre el género *Didemnum* (perteneciente al orden Aplousobranchia) y el género *Ascidia* (perteneciente al orden Phlebobranchia). Sin embargo, en su estudio sólo se basaron en pocas secuencias pertenecientes a ambos géneros. De esto, se puede inferir que la secuencia obtenida en el presente estudio (*Didemnum vanderhorsti*) y la secuencia de referencia (*Didemnum candidum*), probablemente estén mal asignadas molecularmente, es decir, que quizá no se amplificó a la especie, si no, a algún simbiote o algún otro organismo ajeno al individuo.

En el análisis de distancias genéticas entre los dos niveles taxonómicos analizados (especie y género), se pudo apreciar que las secuencias obtenidas en el presente estudio con especies afines al género son diferentes. En cuanto al análisis entre géneros, se evidenció la separación entre los diferentes grupos, pero no se encontró completa congruencia con la sistemática taxonómica, debido a que se esperaba encontrar valores de distancia genética menores entre los géneros pertenecientes a la misma familia e inversamente cuando pertenecen a familias diferentes. Es decir, se

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

encontró mayor distancia entre los géneros *Trididemnum* y *Didemnum* (misma familia) y menor distancia entre *Cystodytes* y *Trididemnum* (familias distintas).

Combinando el análisis de valores Bootstrap y distancias genéticas se puede inferir que dichos valores no son robustos, debido principalmente a la falta de representantes (secuencias) en los diferentes grupos, si se incrementa el conocimiento molecular estos valores tendrían congruencia. De lo anterior, queda en evidencia la falta de estudios moleculares a los miembros de la clase Ascidiacea.

IX. CONCLUSIONES

9.1 Taxonómicas

La taxonomía de la clase Ascidiacea es una disciplina altamente compleja, que además de requerir de un especialista, es necesario seguir adecuadamente e incluso mejorar las técnicas de manipulación, así como realizar añadir fichas, fotografías y mejores descripciones. Además de esto, se recomienda el uso combinado de la taxonomía tradicional con marcadores moleculares, como herramientas para lograr una mejor identificación, con el fin de incrementar el conocimiento faunístico.

Se logró la identificación de 27 especies, de las cuales 16 son nuevos registros (*Diazona* aff. *Carnosa*, *Eudistoma* sp. 1, *Eudistoma* sp. 2, *Eudistoma* sp. 3, *Eudistoma* sp. 4, *Cystodytes* aff. *lobatus*, *Aplidium* sp., *Ascidia liberata*, *Pyura* sp., *Pyura* aff. *Squamulosa*, *Pyura stolonifera*, *Metandrocarpa* aff. *Michaelsoni*, *Phallusia* aff. *Mammillata* y *Phallusia* aff. *nigra*) para las costas del Pacífico mexicano y 11 ya habían sido registradas (*Rhopalaea birkelandi*, *Didemnum* aff. *recurvatum*, *Didemnum vanderhorsti*, *Trididemnum savignii*, *Ascidia ceratodes*, *Ascidia sideralis*, *Ascidia* cf. *sydneiensis*, *Microcosmus exasperatus*, *Pyura haustor*, *Pyura lignosa* y *Styela canopus*).

En general, de los sitios de muestreo, el orden Aplousobranchia fue el mejor representado en los ecosistemas coralinos, con cuatro familias representativas (Diazonidae, Didemnidae y Polyclinidae). La familia Didemnidae fue la mejor representada, en la cual el género *Didemnum* fue el más diverso. De éste, específicamente *Didemnum* aff. *recurvatum* fue la especie más abundante y frecuente en dichos ambientes.

La mayor diversidad de especies se encontró en la región central, es decir, en las costas de Nayarit.

9.2 Moleculares

Se generaron nueve nuevos códigos de barras de ADN, pertenecientes a las siguientes especies: *Cystodytes* aff. *lobatus*, *Trididemnum savignii*, *Microcosmus*

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

exasperatus y *Didemnum vanderhorsti*. Estos serán incorporados al sistema BOLD del consorcio internacional de código de barras de ADN y a la base de datos de Gen Bank, una vez que las especies sean validadas mediante obra publicada.

En la implementación de las herramientas moleculares, los tres órdenes en los que se divide la clase Ascidiacea no se establecieron como grupos monofiléticos. Sin embargo, los individuos estudiados mostraron afinidades con especies de al menos el mismo género, con ello se confirmó la congruencia entre los caracteres genotípicos y fenotípicos.

9.3 Otras

Se contribuyó en la restauración y actualización de material biológico a la colección de ascidias del Pacífico mexicano perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán. En total, se revisaron 390 ejemplares, de los cuales 260 preexistían en la colección del Laboratorio de Ecología del Bentos y 130 fueron colectados por el Laboratorio de Sistemática y Ecología molecular. Estos últimos en 21 localidades distintas, principalmente ecosistemas coralinos ubicados a lo largo de la costa del Pacífico mexicano. Con esto, se amplía la cantidad de registros para dicha costa.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alder, J., 1863. Observations on the British Tunicata with descriptions of several new species.. *Annals and Magazine of Natural History* , 11(63), pp. 153-173.
- Aljanabi, S. & Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), pp. 4692–4693.
- Bonnet, N. & Rocha, R., 2011. The family Ascidiidae Herdman (Tunicata: Ascidiacea) in Bocas del Toro, Panama. Description of six new species. *Zootaxa*, 2864(1), pp. 1-33.
- Bonnet, N. & Rocha, R., 2013. Ascidiidae Herdman, 1882 (Tunicata: Ascidiacea) on the Pacific coast of Panama. *Zootaxa*, 3691(3), pp. 351-364.
- Bonnet, N., Rocha, R. & Carman, M., 2013. Ascidiidae Herdman, 1882 (Tunicata: Ascidiacea) on the Pacific coast of Panama. *Zootaxa*, 3691(3), pp. 351-364.
- Botello, A., Toledo, A., de la Lanza-Espino, G. & Villanueva, S., 2000. The Pacific coast of Mexico. Seas at the millennium: An environmental evaluation. *The Netherlands: Elsevier Science*, 1(1), pp. 473-489.
- Boyd, H., Weissman, I. & Saito, Y., 1990. Morphologic and genetic verification that Monterey Botryllus and Woods Hole Botryllus are the same species. *The Biological Bulletin*, 178(3), pp. 239-250.
- Brusca, R. & Brusca, G., 2003. *Invertebrates*. Segunda ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Brusca, R. & Thomson, D., 1975. Pulmo reef: the only "coral reef" in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 1(3), pp. 37-53.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Carballo, J., 2006. *Aportación al conocimiento de la fauna de ascidias del litoral Pacífico de México*, México: CONABIO.
- Carman, M. et al., 2011. Ascidiars at the Pacific and Atlantic entrances to the Panama Canal. *Invasions*, 6(4), pp. 371-380.
- Clarke, M. & Castilla, J., 2000. Dos nuevos registros de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) para la costa continental de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 73(5), pp. 503-510.
- Cohen, A. et al., 2005. Rapid assessment survey for exotic organisms in southern California bays and harbors, and abundance in port and non-port areas. *Biological Invasions*, 7(6), pp. 995-1002.
- Cole, L. & Lambert, G., 2009. Tunicata (Urochordata) of the Gulf of Mexico. Em: *Gulf of Mexico: Origin, Waters, and Biota*. s.l.:s.n., pp. 1209-1216.
- Darling, J. & Blum, M., 2007. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biological Invasions*. *Biological Invasions*, 9(7), pp. 751-765.
- Davis, A., 1995. Over-exploitation of *Pyura chilensis* (Ascidiacea) in southern Chile: the urgent need to establish marine reserves. *Revista Chilena de Historia Natural*, 68(1), pp. 107-116.
- De Caralt, S. et al., 2002. Contrasting biological traits of *Clavelina lepadiformis* (Ascidiacea) populations from inside and outside harbours in the western Mediterranean. *Biology Invasions*, 244(1), pp. 125-137.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. & Philippe, H., 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 349(7079), pp. 965-968.
- Enochs, I. & Manzello, D., 2012. Responses of cryptofaunal species richness and trophic potential to coral reef habitat degradation. *Diversity*, pp. 94-104.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

EOL, 2018. *Encyclopedia of life*. [Online] Available at: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?map=Pyura+squamulosa> [Acesso em 19 Abril 2018].

Erwin, P. et al., 2014. Down under the tunic: bacterial biodiversity hotspots and widespread ammonia-oxidizing archaea in coral reef ascidians. *International Society for Microbial Ecology*, pp. 575-588.

Faivre, S. et al., 2005. Phase I and pharmacokinetic study of aplidine, a new marine cyclodepsipeptide in patients with advanced malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), pp. 7871-7880.

Griggio, F. et al., 2014. Ascidian Mitogenomics: Comparison of Evolutionary Rates in Closely Related Taxa Provides Evidence of Ongoing Speciation Events. *Genome Biology and Evolution*, 6(3), pp. 591-605.

Hamada, F. et al., 2012. Excitation energy relaxation in a symbiotic cyanobacterium, *Prochloron didemni*, occurring in coral-reef ascidians, and in a free-living cyanobacterium, *Prochlorothrix hollandica*. *Elsevier*, pp. 1992-1997.

Hebert, P., Ratnasingham, S. & Waard, J., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society*, 270(1), pp. S96-S99.

Heller, C., 1878. Beitrage zur nihern Kenntniss der Tunicaten. *Akademie der Wissenschaften in Wien*, 77(1), pp. 83-110.

Heller, W., 1886. Report on the Tunicata collected during the years 1873-1876. Part 2, Ascidiæ compositæ. *Zoological Challenger Expedition*, 14(38), pp. 1-425.

Hernández, A., 2015. *Evaluación morfológica y molecular de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) de Mazatlán, Sinaloa*. Tesis de Licenciatura: Instituto Tecnológico de Mazatlán.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Hernández-Inda, Z., 2003. "Variabilidad inter e intra-específica de la bioactividad de algunas Ascidias del Golfo de California ". *Tesis de maestría*, Volume Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.
- Hernández-Zanuy, A., García-Cagide, A., Borrero, N. & Carballo, J., 2006. Alimentación de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) en dos áreas de manglar de Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 55(2), pp. 499-507.
- Hernández-Zanuy, A. J., Carballo, J., García-Cagide, A. & Naranjo, S. & M. E., 2006. Distribución y abundancia de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) en Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 55(1), pp. 247-254.
- Hirose, E. et al., 2012. First records of Didemnid ascidians harbouring *Prochloro* from Caribbean Panama: genetic relationships between Caribbean and Pacific photosymbionts and host ascidians. *systematics and Biodiversity*, 10(4), pp. 435-445.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 1991. *Datos básicos de la geografía de México*. Segunda ed. México: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
- Iturralde, M., 1996. Taxonomy, abundance, and vertical distribution of ascidians from Tagus Cove, Isabela Island. Issue 1-134.
- Iyappan, K., Ananthan, G. & Sathishkumar, R., 2016. Molecular identification of ascidians from the Palk. *Mitochondrial DNA*, 27(5), p. 3573–3576.
- Jaap, W., 2000. Coral reef restoration. *El Sevier*, pp. 345-364.
- Jimenez, P. et al., 2013. Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(2), pp. 335-343.
- Kott, P., 1985. The Australian Ascidiacea. Part 1, Phlebobranchia and Stolidobranchia. *Memoirs of the Queensland Museum.*, 23(1), pp. 1-439.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Kott, P., 2001. The Australian Ascidiacea Part 4, Aplousobranchia (3), Didemnidae. *Memoirs of the Queensland Museum*, 47(1), pp. 1-407.
- Kumaran, N., Bragadeeswaran, S. & Meenakshi, K., 2013. Mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) DNA sequencing. *Mitochondrial ADN*, 25(2), pp. 131-134.
- Lambert, C. & Lambert, G., 1998. Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. *Marine Biology*, 130(4), pp. 675-688.
- Lambert, C. & Lambert, G., 1998. Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. *Marine Biology*, 130(4), pp. 675-688.
- Lambert, C. & Lambert, G., 2003. Persistence and differential distribution of nonindigenous ascidians in harbors of the Southern California Bight. *Marine Ecology Progress Series*, 259(1), pp. 145-161.
- Lambert, G., 2003. New records of ascidians from the NE Pacific: a new species of *Trididemnum*, range extension and redescription of *Aplidiopsis pannosum* (Ritter, 1899) including its larva, and several non-indigenous species. *Zoosystema*, 25(4), pp. 665-680.
- Lambert, G., 2009. Adventures of a sea squirt sleuth: unraveling the identity of *Didemnum vexillum*, a global ascidian invader. *Aquatic Invasions*, 4(1), pp. 5-28.
- Lambert, G., Shenkar, N. & Swalla, B., 2010. First Pacific record of the north Atlantic ascidian *Molgula citrina* – bioinvasion or circumpolar distribution?. *Aquatic Invasion*, 5(1), pp. 369-378.
- Lee, T. & Shin, S., 2014. Morphological and molecular identification of an introduced alien sea squirt (Tunicata: Ascidiacea) in Korea. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 127(1), pp. 284-297.
- Menna, M., 2009. Antitumor potential of natural products from Mediterranean ascidians. *Phytochemistry Reviews*, 8(2), pp. 461-472.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Meyer, C., Geller, J. & Paulay, G., 2005. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution*, 59(1), pp. 113-125.
- Millar, R., 1975. Ascidians from the Indo-West-Pacific Region in the Zoological Museum, Copenhagen (Tunicata, Ascidiacea).. *Jornal*, 3(20), pp. 205-336.
- Monniot, C., 1994. a Pacific ascidian from Central America, with descriptions of species confused under this name. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 110(1), pp. 41-51.
- Monniot, C., Monniot, F. & Laboute, P., 1991. *Coral reef ascidians of New Caledonia*. Primera ed. France: Orstom.
- Monniot, F., 1985. Ascidades littorales de Guadalupe IX. Características des populations, rapports avec la faune mondiale. *Tethys*, 11(1), pp. 3-4.
- Monniot, F. & Lambert, G., 2008. Coral reef ascidians of New Caledonia. *Tabular keys to worldwide ascidians families and genera*, Issue 10 .
- Monniot, F. & Monniot, C., 1996. New Collections of Ascidians from the Western Pacific. *Micronesica*, 29(3), pp. 199-279.
- Moreira, R., Kremer, L. & Hoch, K., 2012. Lack of COI variation for *Clavelina oblonga* (Tunicata, Ascidiacea) in Brazil: Evidence for its human-mediated transportation?. *Aquatic Invasions*, 7(3), pp. 419-424.
- Moreno-Dávila, 2010. Ascidias (Tunicata: Ascidiacea) de Oaxaca, México. *Tesis de Licenciatura*, Volume Universidad del Mar.
- Moreno-Dávila, B., 2013. Taxonomía y biogeografía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a mantos de rodolitos y bosques de sargazo en el noroeste del Pacífico mexicano. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma de Baja California sur*.
- Moreno, T. & Rocha, R., 2008. Phylogeny of the Aplousobranchia (Tunicata: Ascidiacea).. *Revista Brasileira de Zoología*, 25(2), pp. 269-298.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Okolodkov, Y. et al., 2007. Especies acuáticas no indígenas en México. *Ciencia y Mar*, 11(32), pp. 29-67.
- Palomino, L., 2017. Riqueza y distribución de especies de grupos de Ascidiacea de zonas costeras del Sur del Golfo de México. *Tesis de maestría*.
- Pérez-Portela, R., Durán, S., Cruz, P. & Turon, X., 2007. The genus *Pycnoclavella* (Ascidiacea) in the Atlanto-Mediterranean region: a combined molecular and morphological approach.. *Invertebrate Systematics*, 21(2), pp. 187-205.
- Pyo, J., Lee, T. & Shin, S., 2012. Two recorded invasive alien ascidians (Chordata, Tunicata, Ascidiacea) based on morphological and molecular phylogenetic analysis in Korea. *Zootaxa*, 3368(1), pp. 211-228.
- Ramírez, I., 2013. Distribución de la ascidia exótica invasora *Polyclinum constellatum* Savigny, 1816. *Tesis de licenciatura*, Volume Universidad de Guadalajara.
- Reyes-Bonilla, H. & López-Pérez, A., 1998. Biogeografía de los corales pétreos (Scleractinia) del Pacífico de México. *Ciencias Marinas*, 24(2), pp. 211-224.
- Ribes, M., Coma, R., Atkinson, M. & Kinzie, R., 2005. Sponges and ascidians control removal of particulate organic nitrogen from coral reef water. *Limnology and Oceanography*, 50(5), pp. 1480-1489.
- Ribes, M., Coma, R., Atkinson, M. & Kinzie, R., 2005. Sponges and ascidians control removal of particulate organic nitrogen from coral reef water. *Society of Limnology and Oceanography*, 50(2), pp. 1480-1489.
- Rinehart, K. et al., 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. *Pure and Applied Chemistry*, 53(4), pp. 795-817.
- Rocha, R., Bastos, T. & Moreno, T., 2012. Chaves de identificação de famílias e gêneros de ascídias de águas rasas no Atlântico. *Biotaneotropica*, 12(1), pp. 1-35.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Rocha, R., Faria, S. & Moreno, T., 2005. Ascidians from Bocas del Toro, Panama. I. Biodiversity.. *Caribbean Journal of Science*, 41(3), pp. 600-612.
- Rodríguez, L. & Ibarra-Obando, S., 2008. Cover and colonization of commercial oyster (*Crassostrea gigas*) shells by fouling organisms in San Quintin Bay, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 27(2), pp. 337-343.
- Sale, P., 2004. Connectivity, recruitment variation, and the structure of reef fish communities. *Integrative and Comparative Biology*, pp. 390-399.
- Salgado-Barragán, J., Méndez, N. & Toledano-Granados, A., 2004. *Ficopomatus miamiensis* (Polychaeta: Serpulidae) and *Styela canopus* (Ascidiacea: Styelidae), non-native species in Urías estuary, SE Gulf of California, Mexico. *Biology Marine*, 45(2), pp. 167-173.
- Sanamyan, K. & Schories, D., 2004. Ascidians from Peru. *Spixiana*, 27(3), pp. 193-197.
- Selva, P., Ananthan, G. & Bala, S., 2012. an *Polyclinum madrasensis* (Sebastian, 1952) from Gulf of Mannar, Southeast coast of India. *Global Advanced Research Journal of Biotechnology*, 1(2), pp. 012-016.
- Selva, P., Ananthan, G. & Bala, S., 2012. First record of mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences of ascidian *Polyclinum madrasensis* (Sebastian, 1952) from Gulf of Mannar, Southeast coast of India. *Advanced Research Journal of Biotechnology*, 1(2), pp. 012-016.
- Shenkar, N. et al., 2018. *World Register of Marines Species*. [Online] Available at: www.worms.com [Acesso em 16 Julio 2018].
- Shenkar, N. et al., 2016. Back to solitude: Solving the phylogenetic position of the Diazonidae using molecular and developmental characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100(1), pp. 51-56.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

- Shenkar, N. & Monniot, F., 2006. Population dynamics of coral reef ascidian in a deterioration environment. *Zootaxa*, 1256(1), pp. 11-19.
- Shenkar, N. & Swalla, B., 2011. Global diversity of Ascidiacea. *Public Library of Science*, 6(6), pp. 1-9.
- Sluiter, C., 1909. Die Tunicaten der Siboga-Expedition. Part 2. Die mcrosomon hcidien. *Siboga Expedition*, 56(1), pp. 1-112.
- Smith, K. et al., 2012. Barcoding of the cytochrome oxidase I (COI) indicates a recent introduction of *Ciona savignyi* into New Zealand and provides a rapid method for *Ciona* species discrimination. *Aquatic Invasions*, 7(3), pp. 305-313.
- Spalding, M., Ravilious, C. & Green, E., 2001. *World atlas of coral reefs*. Primera ed. Berkeley: University of California Press.
- Stefaniak, L., Gittenberger, A., Zhang, H. & Lin, S., 2009. Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. *Aquatic Invasions*, 4(1), pp. 29-44.
- Tokioka, T., 1967. Pacific Tunicata of the United Status National Museum. *Bulletin of the United States National Museum*, 251(1), pp. 1-247.
- Tovar-Hernández, M., Suárez-Morales & Yáñez-Rivera, B., 2010. The parasitic copepod *Haplostomides hawaiiensis* (Cyclopoida) from the invasive ascidian *Polyclinum constellatum* in the southern Gulf of California. *Bulletin of Marine Science*, 86(3), pp. 637-648.
- Tovar-Hernández, M., Yáñez-Rivera, B., Aguilar-Camacho, J. & Ramírez-Santana, I., 2012. *Guía de invertebrados acuáticos exóticos en Sinaloa*. primera ed. Mazatlán: Geomare, AC USFWS, INE-SEMARNAT.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

Turón, X., 1986. Morfología de las espículas en las especies de la familia Didemnidae (Ascidiacea) del litoral de Cataluña e Islas Baleares. *Miscellania Zoológica*, 10(1), pp. 213-222.

Turon, X. & López, S., 2004. Ascidian molecular phylogeny inferred from mtDNA data with emphasis on the Aplousobranchiata. *Elsevier*, 33(1), pp. 309-320.

Van Name, W., 1902. The ascidians of the Bermuda Islands Trans. *Connecticut Academy Science*, 11(1), pp. 325-412.

Van Name, W., 1921. Ascidians of the West Indian region and southeastern United States.. *Bulletin of the American Museum of Natural History* , 44(16), pp. 283-494.

Van Name, W., 1924. Ascidians from Curacao. *Bijdragen Totde Dierkunde*, 23(1), pp. 23-32.

Van Name, W., 1945. North and South American ascidians. *Bulletn of the American Museum of Natural History*, 84(1), pp. 1-462.

World Register of Marine Species, 2017. *WORMS*. [Online] Available at: <http://www.marinespecies.org/index.php> [Acesso em 18 Noviembre 2017].

XI. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN genómico se empleó el protocolo de (Aljanabi y Martinez, 1997), el cual consiste en los siguientes procedimientos:

1. Cortar 50 mg de tejido lo más finamente posible.
2. Colocar el tejido en un tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir 350 μ l de buffer de extracción (100 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl, SOS al 1% 50 mM EDTA pH 8.0).
3. Adicionar 20 μ l de proteinasa K y dar vórtex brevemente.
4. Colocar los tubos en la incubadora a 55°C por 12 horas (o bien hasta que la digestión se halla efectuado).
5. Adicionar 600 μ l de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y dar vórtex brevemente
6. Poner en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos.
8. Extraer 500 μ l de la capa acuosa (superior) y transferir a un tubo eppendorf nuevo. Tener cuidado en no tocar la interfase, si esto ocurre, volver a centrifugar a 13,000 gravedades por 5 minutos.
9. Adicionar 50 μ l de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 1 ml de etanol absoluto frío.
10. Invertir varias veces los tubos y ponerlos a -20°C por lo menos una hora (o 30 minutos a 80°C). También puede dejarse toda la noche.
11. Centrifugar a máxima velocidad por 20 minutos.
12. Decantar el líquido de los tubos, sin perder el pellet formado.
13. Adicionar 750 μ l de etanol al 70% y ponerlo en agitación a temperatura ambiente por 15 minutos.
14. Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos.
15. Decantar el etanol.
16. Dejar secar el pellet.
17. Re-suspender el pellet formado en 50 a 100 μ l de TE pH 8.0, dependiendo del tamaño que éste tenga. Dejar reposar por lo menos una hora.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

18. Correr la muestra del paso anterior en un gel de agarosa al 2% (3 μ l de ADN y 2 μ l de loading buffer).

El criterio empleado para determinar si una extracción tiene un resultado positivo o negativo está regido por las siguientes condiciones: 1. Presencia de una banda de amplio grosor y 2. Ausencia de material degradado o residuos.

Anexo 2. Protocolo de purificación de productos de PCR.

1. Extraer los productos de los PCR que amplificaron secuencias de ADN y añadir a un tubo nuevo: Contabilizar los μ l de productos de PCR extraídos.
2. Añadir a dicho tubo el doble de μ l de PEG que el obtenido en los productos de PCR. Mezclar con ayuda de la micropipeta (absorbiendo y expulsando el líquido). Dar vórtex brevemente.
3. Dejar los productos de PCR + PEG incubar a -20°C por 40 minutos.
4. Centrifugar a 13,000 revoluciones por 20 minutos.
5. Decantar el sobrenadante.
6. Agregar 125 μ l de etanol al 80% frío por las paredes del tubo y dejar reposar por 1 minuto. Si se expulsa de manera espontánea se deberá reposar por 2 minutos.
7. Repetir el paso 5 y 6.
8. Poner a secar con la tapa abierta, hasta que el pellet se seque.
9. Disolver el producto de PCR en 25 μ l de Te; pipetear varias veces para homogeneizar el ADN.
10. Correr un gel de verificación, agarosa al 2% teñido en bromuro de Etidio.

Anexo 3. Secuenciación de productos de PCR

1. Se preparan reacciones de 25 μ l de los productos corroborados de PCR a una concentración de 50Ng/ μ l, y 20 μ l de primers por muestra a una concentración de 10 pmole/ μ l = 60 ng/ μ l.

“Taxonomía de ascidias (Tunicata: Ascidiacea) asociadas a ecosistemas coralinos del Pacífico mexicano: morfología y códigos de barras de ADN”

2. Se envían a la empresa MacroGen ubicada en Japón para su secuenciación.