



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Estructura genética y morfometría geométrica del clado de *Ischnochiton erythronotus* (Adams, 1845) (Mollusca: Polyplacophora) en el Golfo de México y mar Caribe

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JESSICA RAQUEL HERNÁNDEZ PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL: **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: **DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA**
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. MICHEL EDMOND HENDRICKX RENERS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

CD. MX. JUNIO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Estructura genética y morfometría geométrica del clado de *Ischnochiton erythronotus* (Adams, 1845) (Mollusca: Polyplacophora) en el Golfo de México y mar Caribe

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JESSICA RAQUEL HERNÁNDEZ PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL: **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: **DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA**
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. MICHEL EDMOND HENDRICKX RENERS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, CD. MX. JUNIO, 2019



OFICIO CPCB/571/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Me en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 11 de marzo de 2019, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, a la alumna **HERNÁNDEZ PÉREZ JESSICA RAQUEL** con número de cuenta **307164821** con la tesis titulada "**Estructura genética y morfometría geométrica del clado de *Ischnochiton erythronotus* (Adams, 1845) (Mollusca: Polyplacophora) en el Golfo de México y mar Caribe**", bajo la dirección del **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**:

Presidente:	DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal:	DR. ALEJANDRO EMMANUEL GONZÁLEZ VOYER
Secretario:	DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA
Suplente:	DR. CARLOS SALVADOR PEDRAZA LARA
Suplente	DR. PINDARO DÍAZ JAIMES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 14 de mayo de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Ecología por permitirme realizar mis estudios de maestría contribuyendo a mi formación académica.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por la beca otorgada, ya que gracias a ella puede continuar con mi formación académica.

Al Dr. Daniel Piñero, quien dirigió este trabajo como tutor principal.

A la Dra. Patricia Ornelas, y al Dr. Michel Hendrickx, por ser parte de mi comité académico y contribuir en este trabajo paso a paso.

Financiamiento

Instituto de Ecología

Permiso

Permiso de Pesca de Fomento No PPF/DGOPA-221/16.

24 de octubre de 2016, Mazatlán, Sinaloa

Agradecimientos personales

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), porque en ella me he formado académicamente. Pero sobre todo porque me permitió conocer a las personas que me han hecho crecer como ser humano, por ser mi hogar. Esto es por ella y para ella.

Al Dr. Daniel Piñero, por aceptar dirigir esta tesis sin conocerme y sin conocer a los quitones. Por brindarme su apoyo y confianza, por dirigirme académicamente, y sobre todo por mantenerse siempre como un gran ser humano. No cabe duda de que se enseña mucho más con el ejemplo.

A la Dra. Patricia Ornelas por siempre tener comentarios para mejorar el trabajo, por todas sus enseñanzas y por contagiarme el gusto de ver las “formas”. Al Dr. Michel Hendrickx por su disposición y comentarios que fueron fundamentales en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ella Vázquez, al Dr. Alejandro González, al Dr. Píndaro Díaz y el Dr. Carlos Pedraza por los comentarios que sin duda ayudaron a mejorar este trabajo.

Al M. en C. Brian Urbano, a la Biol. Erika Alarcón y a la M. en C. Ia Toledano, por toda su ayuda y esfuerzo en los muestreos realizados para obtener los quitones estudiados. Sin duda fue un super “Pasón...”

Al centro de buceo “SCUBAVER”, por las facilidades y apoyo durante los muestreos en el Sistema Arrecifal Veracruzano

Al Dr. Nuno Simões y a la Dr. Deneb Ortigosa, por el préstamo de ejemplares de quitones depositados en la Colección Malacológica de la Península de Yucatán. Definitivamente, esas muestras fueron parte esencial en los resultados obtenidos en este trabajo.

A la Dra. Martha Reguero, por permitirme utilizar ejemplares de quitones depositados en la Colección Malacológica Dr. Antonio García-Cubas. Por permitirme utilizar el laboratorio de Malacología para trabajar y sobre todo por hacerme sentir parte de él.

A la Dra. Edna Naranjo, por el préstamo de ejemplares de quitones depositados en la Colección Nacional de Moluscos.

A la Dra. Tania Garrido por asesorarme en el mundo del laboratorio de biología molecular.

A la Biol. Susana Guzmán, por sus asesorías en el uso del microscopio multifocal, Leica donde se tomaron todas las fotografías utilizadas en los análisis de morfometría geométrica de este trabajo.

A la M. en C. Berenit Mendoza, por la ayuda en tomar las fotografías con microscopía electrónica de barrido, que se presentan en este trabajo.

A la Dra. Alejandra Moreno por darme *tips* para el manejo correcto de los datos.

A mis padres, Salvador y Toribia, porque me han conducido y apoyado en cada etapa de la vida. A mis hermanos Pamela, Jaky, Chava, Xochitl y Daniel, porque su compañía y apoyo siempre ha hecho más divertida la vida.

A mis amigos Eric, Sharif, Ia, Chavita, por siempre estar. Por compartir el gusto por los invertebrados y sobre todo por ser grandes personas con las que he podido compartir todo tipo de experiencias.

Al laboratorio de Genética y Ecología por recibirme este tiempo. A las personas que ahí conocí y que me han dejado todo tipo de enseñanzas: Gus, Alfredo, Vero, Idalia, Azalea, Lau, Alex, Chris, Jorge. A Oscar y Pepillo por siempre dar ese toque de familiaridad y confianza. A Sebas por darme ánimos para acabar los scripts jajaja. A Ruth por siempre enseñarme a ver el lado bueno de las cosas. A Nancy, por compartir enseñanzas académicas y personales, por escucharme en los momentos de felicidad y frustración.

A mis amigos malacólogos que hacen todo más chévere; Omar, Porfi, Mike y Marbe. A Gabriela, Lina, Etel, Pame, Pao y Citlalli, por ser unas mujeres fantásticas que hacen los momentos más divertidos y llevaderos. A Brian, por el apoyo en todo momento y por contagiar el gusto por los moluscos. A toda la gente del Malacolab, porque siempre me hacen sentir como en casa.

A mis amigos Aket, Lucero, Omar, Dona, Davi' y a La Bombilla por compartir el gusto de contagiar un poquito lo maravilloso de la ciencia.

A mis amigas y compañeras de jazz: Karina, Melissa, Carmen, Karen, Rox, Marlen y por supuesto a Kenia. Porque el baile ha dado un toque especial en el día a día.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
CAPÍTULO 1.....	4
Estructura genética del clado de <i>Ischnochiton erythronotus</i> (Adams, 1845) (Mollusca: Polyplacophora) en el Golfo de México y mar Caribe.....	4
INTRODUCCIÓN	4
Flujo de genes en organismos marinos.....	4
HIPÓTESIS.....	5
ANTECEDENTES.....	6
OBJETIVOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
ÁREA DE ESTUDIO	7
Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV).....	7
Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM).....	7
Arrecifes del Banco de Campeche (ABC)	8
Obtención de muestras	8
Trabajo de campo	8
Préstamo de colecciones malacológicas.....	8
Trabajo de laboratorio	9
Análisis de datos	9
Diferenciación genética entre poblaciones.....	10
Estructura genética de las poblaciones.....	10
Aislamiento por distancia.....	11
D de Tajima y <i>F</i> de Fu y Li	11
Relaciones filogenéticas y distancias genéticas	11
RESULTADOS.....	12
Diferenciación genética entre poblaciones.....	12
Estructura genética de las poblaciones.....	15
Aislamiento por distancia.....	17
D de Tajima y <i>F</i> de Fu y Li	17
DISCUSIÓN	24

Estructura genética de las poblaciones.....	24
Reconstrucción filogenética en el clado de <i>I. erythronotus</i>	27
CONCLUSIONES	28
CAPÍTULO II.....	29
Morfometría geométrica del clado de <i>Ischnochiton erythronotus</i> (Adams, 1845) (Mollusca: Polyplacophora) en el Golfo de México y mar Caribe.....	29
INTRODUCCIÓN	29
ANTECEDENTES.....	32
HIPÓTESIS	33
JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Obtención de fotografías	34
Selección de <i>landmarks</i> y <i>semilandmarks</i>	36
Análisis de datos.....	36
RESULTADOS.....	38
Variación de la forma.....	38
Variación de la forma en cada vista	40
Relación entre tamaño y forma	41
Variación de la forma entre sistemas arrecifales.....	43
Prueba de alometría.....	45
Análisis de la forma entre grupos genéticos.....	46
Análisis del ángulo de las valvas.....	46
Estructuras duras de los quitones, entre sistemas arrecifales.	48
Valva cefálica (I).....	48
Valvas intermedias (II-VII)	49
Valva anal (VIII)	49
Acercamiento a la escultura del tegumento.....	51
Escamas en el cinturón.....	52
Rádula	52
DISCUSIÓN	53
Morfología vista con MEB.....	56
DISCUSIÓN GENERAL.....	56

CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS CITADAS.....	58
APÉNDICE 1	66
Estructuras duras de los quitones dentro de los arrecifes.....	66
Valva cefálica y anal	66
Valva intermedia (V).....	66
Cinturón.....	69
Rádula.....	69
ANEXOS.....	71
Capítulo 1	71
ANEXOS.....	76
Capítulo 2.....	76

RESUMEN

La riqueza de especies de poliplacóforos varía en los principales sistemas arrecifales del Atlántico mexicano. En Veracruz hay un menor registro de especies respecto de los arrecifes del banco de Campeche (ABC) y el Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM). *Ischnochiton erythronotus* se ha reportado en tales zonas, por lo que constituye un buen modelo para evaluar la dispersión de estos moluscos. En este trabajo se abordó un análisis genético utilizando dos genes mitocondriales y uno nuclear, para evaluar la posible conexión genética entre poblaciones de *I. erythronotus*. Además, se utilizó morfometría geométrica para conocer posibles variaciones en la forma de estos quitones, para lo que se analizaron la forma del cuerpo completo, la pendiente del área posmucronal y la valva V en vista dorsal. También se incluyó un acercamiento fino de las valvas, los dientes de la rádula y las escamas del cinturón utilizando microscopía electrónica de barrido.

En los análisis genéticos, los valores de F_{ST} obtenidos indican subdivisión que concuerda con la estructura genética propuesta con la asignación de ancestría realizada con Structure. De igual manera las redes de haplotipos muestran que las poblaciones del sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) son genéticamente distintas a las que se ubican en los ABC y el SAM. Mientras que entre las poblaciones de estos dos últimos arrecifes sí comparten grupos genéticos. Las relaciones filogenéticas obtenidas con inferencia bayesiana y con máxima verosimilitud agrupan a las poblaciones del SAV en un clado distinto del resto. Además, los valores de las distancias genéticas que existen entre ambos clados se encuentran entre los reportados entre especies del mismo género de quitones. La morfometría geométrica permitió observar diferencias entre estos dos clados evaluando la forma del cuerpo completo y la forma de la valva V. Con tales estructuras también se obtuvieron valores significativos en la prueba de alometría, lo que indica diferencias en la forma de los quitones de ambos clados debido a la talla. Con base en los resultados observados, los clados obtenidos fueron llamados *Ischnochiton* sp. e *I. erythronotus*, entre los cuales las diferencias morfológicas observadas se encuentran en la escultura del tegumento, los dientes laterales de la rádula y el número de estrías en las escamas del cinturón.

ABSTRACT

The specific richness of Polyplacophora differs among the main coral reef systems in the Mexican Atlantic. In Veracruz there is a lower number of species with respect to the Mesoamerican Barrier Reef System (MBRS) and Campeche Bank Reefs (CBR). *Ischnochiton erythronotus* is reported both zones so that is the better option to evaluate the marine dispersion to this molluscs. In this work a genetic analysis was realized using two mitochondrial genes and one nuclear gen, to evaluate the genetic connection between *I. erythronotus* populations. Geometrics morphometrics was used to know possible variations in the shape of these chitons for what the complete body, slope of posmucronal area of tail valve and valve V were analyzed. A fine approach of the valves, the radula teeth and scales girdle using scanning electron microscopy was also included.

In the genetic analysis, the values indicate population subdivision that is like the genetic structure according to Structure ancestry estimated. Similarly, haplotype network show that Veracruz Coral Reef System (VCRS) population are genetically distinct from those located in CBR and MBRS. While among the populations of these last two coral reefs do share genetic groups. Bayesian phylogenetic inference and phylogenetic analysis using maximum likelihood group the population of VCRS in a separate clade. Also, genetic distances between groups are similar to distance between the different chitons species. Morphometric geometrics analysis allowed differences between both clades according to full body and valve V shape. With these structures, significant values were also obtained in the allometry test, which indicates differences in the shape of the chitons of both clades due to size. Morphological difference between *Ischnochiton* sp. and *I. erythronotus* are tegmental sculpture, lateral radular teeths and riblets in scales girdle

INTRODUCCIÓN

En poblaciones separadas geográficamente, la conexión genética depende del flujo génico entre ellas. Cuando el flujo de genes entre los grupos es alto, la variación genética entre poblaciones se homogeniza, mientras que, si no lo es, las poblaciones se diferencian y se dice que existe estructura en las poblaciones (Slatkin, 1994; Freeman y Herron, 2002; Hedrick, 2011). La estructura de las poblaciones está determinada tanto por la historia demográfica, es decir, si las poblaciones han crecido o decrecido (Eguiarte et al., 2013), como por la estructura genética. En esta última el flujo génico es determinante, ya que cuando existe flujo génico entre poblaciones éstas podrían evolucionar juntas (Slatkin, 1994).

Así, la diversidad genética se puede estudiar utilizando genética de poblaciones. Ésta considera que los cambios de la abundancia relativa de los caracteres de los individuos que las conforman se relacionan con los cambios en la abundancia relativa de los alelos que los determinan (Freeman y Herron, 2002; Piñero et al., 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien los arrecifes de coral son un ambiente potencial para albergar a especies de quitones, en los arrecifes y costas de Veracruz solo existe el registro de ocho especies (Alarcón-Chavira, 2014; Hernández, 2015; Sanvicente-Añorve et al., 2018; Suárez, 2018). De tales registros, solo dos se encuentran en el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) y el resto han sido reportadas en costas rocosas al sur del estado, así como en arrecifes que no se incluyen en el SAV. Por su parte, en el arrecife Alacranes que pertenece a los arrecifes del banco de Campeche (ABC), localizados frente a la península de Yucatán en el golfo de México, se han registrado ocho especies de quitones (Reyes-Gómez et al., 2017). Mientras tanto, hacia el mar Caribe en el Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM), en su porción mexicana, se reportan 26 especies (Lyons y Moretzsohn, 2009; Alarcón-Chavira, 2014; Reyes-Gómez et al., 2017). Estos arrecifes se encuentran relativamente cerca geográficamente, lo que junto a las corrientes marinas podrían favorecer el flujo genético. De esta forma las poblaciones deberían ser genéticamente homogéneas. Sin embargo, esto no se refleja en términos de riqueza de especies de quitones. Por tal motivo es necesario llevar a cabo estudios de genética de poblaciones de las especies que se encuentren en los arrecifes del golfo de México y Mar Caribe con el fin de estimar el grado de conectividad entre arrecifes. En este caso *I. erythronotus* (Adams, 1845) que ha sido bien identificada en las poblaciones del Caribe y reportada en las poblaciones de Veracruz. Sin embargo, en estas últimas no se ha corroborado la identificación de la especie, la cual se ha basado únicamente en la morfología, por lo que en el presente estudio se hará referencia a todos los quitones empleados como *I. erythronotus*.

CAPÍTULO 1

Estructura genética del clado de *Ischnochiton erythronotus* (Adams, 1845) (Mollusca: Polyplacophora) en el Golfo de México y mar Caribe.

INTRODUCCIÓN

Flujo de genes en organismos marinos

Los quitones pertenecen al phylum Mollusca, el segundo phylum más diverso del reino Animal. Forman la clase Polyplacophora con cerca de 920 especies vivas (Schwabe, 2005). Esta clase está representada por organismos conocidos como quitones (Kaas y Van Belle, 1985a; García-Ríos, 2003; Eernisse, 2007). Los quitones se caracterizan por presentar una concha de aragonita dividida en ocho valvas rodeadas por un cinturón (Todt et al., 2008). Son exclusivamente marinos y se distribuyen en todas las costas el mundo. La mayoría de las especies se encuentran viviendo en sustratos duros como son costas rocosas y arrecifes de coral (Kaas y Van Belle, 1985; García-Ríos, 2003; Eernisse, 2007). En los organismos marinos, el flujo de genes tiene un componente asociado a las corrientes marinas y es determinado por el tamaño de las larvas (Hellberg et al., 2002), ya que en estadios larvarios los remolinos y giros de las corrientes marinas pueden promover la dispersión o retención de los individuos (Carrillo et al. 2017). Éste es el caso de los polioplacóforos pues estos moluscos presentan una larva trócofora lecitotrófica que permanece en la columna de agua de algunos minutos a pocos días (Todt et al. 2008). Las larvas lecitotróficas cuentan con una mayor cantidad de vitelo proveniente del huevo y que funciona como alimento para la larva, es decir, energéticamente dependen de los padres. Sin embargo, al no depender de los recursos del medio la mortalidad se reduce cuando las condiciones ambientales no son favorables (Cartes, 2009).

En la zona del golfo de México considerada por Felder y Camp (2009), se tiene el registro de 41 especies de poliplacóforos (Lyons y Moretzsohn, 2009), de las cuales 21 se encuentran en México. En el Atlántico mexicano se han reportado alrededor de 30 especies (Castillo Rodríguez, 2014; Reyes- Gómez et al., 2017). Entre éstas, *Ischnochiton erythronotus* es de las pocas especies que aparece tanto en las listas del golfo de México como en el mar Caribe incluyendo la porción mexicana. De acuerdo con Lyons y Moretzsohn (2009), en el mar Caribe se encuentran 13 especies de la familia Ischnochitonidae, siete del género *Ischnochiton*, cuatro de *Stenoplax* y una especie para *Connexochiton* y *Stenosemus*. *Ischnochiton dilatoscultus*, *I. hartmeyeri*, *I. niveus*, *I. papillosum*, *I. pseudovigaratus* e *I. striolatus* son las especies reportadas del género *Ischnochiton*, lo cual a su vez indica una distribución potencial para el golfo de México.

Los quitones de la especie *Ischnochiton erythronotus* vive en lugares poco profundos hasta los 10m de profundidad, bajo rocas y corales enterrados en la arena y llega a medir hasta 15mm (Kaas y Van Belle, 1987; García-Ríos, 2003). Se distribuye en: Florida, Bahamas, Islas Caimán, Puerto Rico, Jamaica, islas Vírgenes, San Eustaquio, Guadalupe, Barbados, Santa Cruz, Colombia, México (Quintana Roo), cayos de Florida y Brasil (Kaas y Van Belle, 1987; García-Ríos, 2003; Alarcón-Chavira, 2014, Reyes-Gómez et al., 2017).

Ubicación taxonómica

- Phylum Mollusca
- Clase Polyplacophora Gray, 1821
- Orden Chitonida Thiele, 1909
- Familia Ischnochitonidae Dall, 1899
- Género *Ischnochiton* Gray, 1847
- Especie *Ischnochiton erythronotus* (Adams, 1845)

HIPÓTESIS

Debido a que el golfo México es un sistema semi cerrado con una entrada de agua proveniente del mar Caribe, se espera que el movimiento de larvas y por ende el flujo genético entre las poblaciones en diferentes arrecifes del clado de *Ischnochiton erythronotus* esté relacionado con el movimiento de las corrientes marinas. Ya que el Sistema Arrecifal Veracruzano se ubica en el golfo de México, se espera que sus poblaciones sean genéticamente distantes a las poblaciones de los arrecifes del banco de Campeche, y más distantes de las poblaciones del Sistema Arrecifal Mesoamericano. Mientras tanto, se espera que las poblaciones de estos dos últimos sistemas arrecifales mantengan mayor conexión genética entre ellos que con las poblaciones del golfo de México.

ANTECEDENTES

Okusu y colaboradores (2003) propusieron una filogenia de los poliplacóforos utilizando los marcadores, COI, 16S, H3, 18S y 28S. Se incluyeron 28 especies de quitones de nueve familias, así como otros moluscos. Sus resultados soportan a Polyplacophora como un grupo monofilético. Grandidge (2011) analizó la estructura de las poblaciones de *I. striolatus* en el Atlántico colombiano. En este trabajo, las poblaciones fueron analizadas con COI y se utilizó como grupo externo a *I. erythronotus*. Sus resultados indican que se trata de una sinonimia. Doonan et al. (2012), evaluaron el flujo de genes del quitón *Katharina tunicata* en el Pacífico norte, utilizando inter secuencias simples repetidas (ISSR, por sus siglas en inglés) y genes mitocondriales. No observaron estructura en las poblaciones evaluadas. Owada (2018) realizó la filogenia del género *Ischnochiton* en Japón, incluyó siete especies del género y las analizó con cuatro genes: 16S, COI, 18S y 28S, aunque morfológicamente cuatro de ellas eran similares, genéticamente se distinguieron una de otra.

Galván-Quesada et al. (2016) reconstruyeron la filogenia molecular y la filogeografía del género *Dormitator*, se trata de un pez distribuido en el Pacífico y el Atlántico. En dicho trabajo se incluyeron poblaciones del golfo de México y el mar Caribe; encontraron que las poblaciones de estos sitios pertenecen a clados distantes, probablemente separados por factores como cambios oceanográficos en el Pleistoceno, las corrientes de Florida, del Golfo, la Ecuatorial y principalmente por la corriente de Lazo, pues se ha propuesto como barrera entre el Golfo de México y el Mar Caribe.

OBJETIVOS

General

- Caracterizar la genética de poblaciones del clado de *I. erythronotus* a partir de los marcadores COI, 16S y 28S en poblaciones de los sistemas arrecifales del golfo de México y mar Caribe en su porción mexicana.

Particulares

- Conocer la estructura genética de las poblaciones de *I. erythronotus* y su variación en las poblaciones de los arrecifes estudiados.
- Definir si todos los grupos considerados en el clado de *I. erythronotus* pertenecen a la misma especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV)

El Sistema Arrecifal Veracruzano cuenta con el nombramiento oficial de Parque Nacional, se compone de 45 arrecifes, dividido en el grupo que se encuentra frente al puerto de Veracruz y Boca del Río y el localizado frente a Antón Lizardo (SEMARNAT, 2017). Al sur de Veracruz se encuentra el arrecife La Perla del Golfo que no pertenece al SAV. Sin embargo, en los trabajos de Hernández (2015), Sanvicente-Añorve et al. (2018) y Suárez (2018) se han reportado nueve especies de quitones en ésta y zonas aledañas. Por lo anterior La Perla del Golfo se tomará en cuenta en este estudio como parte del SAV debido a su cercanía geográfica.

Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM)

Sistema Arrecifal Mesoamericano es el segundo sistema arrecifal más grande del mundo. Se caracteriza por encontrarse a <10 km de la línea de costa. Se extiende frente a las costas de México, Belice, Guatemala y Honduras (Carrillo et al., 2015), y en México abarca desde isla Contoy hasta Xcalak, extendiéndose a Belice (Pérez-Cervantes et al., 2017).



Figura 1.1. Ubicación geográfica de las poblaciones incluidas. Los colores representan los diferentes sistemas arrecifales: SAV- Sistema Arrecifal Veracruzano, ABC-arrecifes del banco de Campeche y SAM-Sistema Arrecifal Mesoamericano. Los círculos marcan las localidades muestreadas y los triángulos el material obtenido por préstamos de las colecciones. El nombre de las localidades se incluye en el texto de esta sección.

Arrecifes del Banco de Campeche (ABC)

Este sistema arrecifal se encuentra al norte de la península de Yucatán y se encuentra formado por los arrecifes: cayo Arcas, cayo Arenas, arrecife Alacranes y arrecife Triangulo (Tunnell et al., 2010), se trata de pequeñas áreas de arrecifes de plataforma que se caracterizan por estar alejados de la costa a unos 80-130 km (Pérez-Cervantes et al., 2017).

Obtención de muestras

Trabajo de campo

Para realizar los muestreos en los arrecifes se contó con el permiso de Pesca de Fomento No PPF/DGOPA-221/16 emitido por CONAPESCA. Se realizaron muestreos en el SAV: Arrecife La Gallega y las playas Mocambo y El Morro de la Mancha en Veracruz. En el SAM en su porción mexicana: isla Mujeres, Puerto Morelos, Akumal y Xcalak. En las localidades seleccionadas se realizó buceo “Scuba” por cuatro personas durante aproximadamente dos horas. Cabe mencionar que en el SAV se revisaron los arrecifes Blanquita, isla Verde, Hornos, Pájaros, Rizo y playa Muñecos, pero no se encontraron quitones de ninguna especie, por lo que no fue posible incluir estas localidades. Mientras que en el SAM también se muestrearon los arrecifes de Mahahual, pero solo se encontró un individuo de *I. erythronotus* por lo que la localidad no pudo ser incluida en los análisis.

La recolección de muestras consistió en levantar las rocas sueltas para buscar individuos de *I. erythronotus* y una vez localizados fueron colocados en frascos con agua de mar. En superficie todos los individuos fueron colocados en charolas con agua de mar que fue sustituida por etanol al 96% una vez que los quitones se habían relajado y siempre manteniéndolos en superficie plana.

Préstamo de colecciones malacológicas

Se obtuvieron muestras mediante el préstamo de las colecciones nacionales: Colección Nacional de Moluscos (CNMO) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Colección Malacológica Dr. Antonio García-Cubas (COMA) del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM y de la Colección de Moluscos de la Península de Yucatán (CMPY) de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación Sisal de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Con el trabajo de campo y los préstamos se obtuvieron muestras (el total se encuentra en el anexo A) de los principales sistemas arrecifales del Atlántico mexicano permitiendo contar con muestras de siguientes poblaciones (Figura 1.1):

- SAV- La Gallega (Ga), El Morro de la Mancha (Mr), playa Mocambo (Mo) y La Perla del Golfo (PG).

- ABC- arrecife Cayo Arcas (Ar), arrecife Cayo Arenas (An) y arrecife Alacranes (Al).
- SAM- Isla Mujeres (Mu), Punta Brava, Puerto Morelos (PM), Akumal (AK) y Xcalak (Xc).

Trabajo de laboratorio

Todos los individuos fueron observados con microscopio para cortar entre un tercio y un quinto del pie. Esta porción del tejido fue preservada en etanol al 96% y fue utilizada para realizar la extracción de ADN.

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit de QIAGEN *DNeasy Blood & Tissue*, siguiendo el protocolo de manufactura, solo se hicieron pequeñas modificaciones en el volumen de elución final, pues solo se utilizaron 80µL de buffer AE. Se amplificó el ADN realizando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un termociclador Eppendorf, Mastercycler Nexus. Se amplificaron los marcadores moleculares mitocondriales COI y 16S, y el marcador nuclear 28S rRNA (Tabla 1.1). Estos marcadores fueron elegidos de acuerdo con Okusu et al. (2003), Kelly et al. (2010), Grandidge (2011), Fernández-Pérez et al. (2017), Villamor et al. (2014) y Li et al. (2016). Los individuos de las poblaciones del SAM y los ABC no pudieron ser amplificadas con los primers LCO y HCO, por lo que se hizo una combinación del *reverse* HCO2198 y el *forward* COXAF utilizado en el trabajo de Li et al. (2016), las especificaciones se encuentran en el anexo 1.1. El protocolo de PCR que se utilizó para 16S y 28S se tomó de Okusu et al. (2003) y el de COI, de Grandidge (2011). Este último se modificó en una serie de pruebas donde se hicieron gradientes de concentración de algunos reactivos, y un gradiente de temperatura, estas modificaciones fueron evaluadas corriendo las PCR en geles de agarosa al 1% y con esto los protocolos fueron estandarizados como se muestra en el anexo 1.2. Los productos de PCR fueron enviados al servicio de secuenciación de la empresa *Macrogen*, Korea donde se realizó secuenciación Sanger.

Análisis de datos

Las secuencias recibidas fueron editadas con Geneious v7.1.9 (Kearse et al., 2012) y alineadas con MUSCLE (Goujon et al., 2010). Las secuencias fueron analizadas utilizando DnaSP v6.10.03 (Rozas et al., 2017), para conocer el tamaño del gen, número de haplotipos, el número de sitios polimórficos, la diversidad nucleotídica y la diversidad de haplotipos. Esta información también se obtuvo para cada grupo del clado (Anexo 2). El total de individuos secuenciados para cada gen se encuentra en el anexo A.

Tabla 1.1 Nombre, secuencia, temperatura de fusión (T_m , “melting temperature”) de los *primers* de los genes utilizados. Los primers fueron obtenidos según Okusu et al. (2003), Li et al. (2016) *.

Nombre	Secuencia	T_m (°C)
28S rRNA Nuclear		
28Sa	5'-GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA-3'	66
28Sb	5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC-3'	64
16S rRNA Mitochondrial		
16Sa	5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	59.7
16Sb	5'-CTC CGG TTT GAA CTC AGA TCA-3'	64.9
COI Mitochondrial		
LCO1490	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'	62.6
HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'	64.1
COXAF*	5' -CWA ATC AYA AAG ATA TTG GAA C-3'	60

Diferenciación genética entre poblaciones

Para evaluar posible diferenciación genética entre poblaciones del clado de *I. erythronotus*, se calcularon los valores de F_{ST} y G_{ST} dentro y entre las poblaciones, y dentro y entre los sistemas arrecifales. Tales valores se obtuvieron en Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) y posteriormente fueron graficados en un diagrama de caja y bigote, y con un *heatmap*, respectivamente, utilizando la librería de R *adeigenet*. G_{ST} al igual que F_{ST} es coeficiente de diferenciación genética, pero se utiliza para evaluar un número ilimitado de alelos por loci (Nei, 1975). Estos valores se calcularon para cada gen y con los tres genes concatenados.

Para medir la varianza genética por arrecifes (grupos) al que pertenecen las poblaciones, se realizaron análisis de varianza molecular (AMOVA) con los índices de fijación: F_{CT} (entre grupos), F_{SC} (entre poblaciones dentro de grupos) y F_{ST} (entre poblaciones) para cada uno de los genes considerando como grupos a los arrecifes, con Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

Estructura genética de las poblaciones

Para estimar el número de grupos genéticos que existen en las poblaciones, se realizó una asignación bayesiana utilizando Structure v2.3.3 (Pritchard et al., 2000). Se utilizó GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) para transformar el archivo “.fasta” donde se encontraban las secuencias con los genes concatenados en un archivo “.txt” de entrada para Structure. En Structure se utilizó un burnin de 30,000 y una longitud de cadena de 120,000 réplicas, se probaron $K= 1-5$ con 25 réplicas cada una. Se eligió el número de grupos genéticos (K) según la mayor probabilidad

posterior (P(K|X)) (Pritchard y Wen, 2004). También se construyó una red de haplotipos con *median joining* para cada uno de los genes, utilizando Network 4.6.1.6 (Bandelt et al., 1999).

Aislamiento por distancia

Se realizó la prueba de Mantel para saber si existe aislamiento por distancia. Se realizó una primera prueba evaluando todas las poblaciones de los tres sistemas arrecifales. La prueba se repitió una vez más, pero tomando por separado las poblaciones de los dos principales clados filogenéticos. En ambos casos se utilizaron los valores de F_{st} y las distancias geográficas medidas en km, obtenidas en *Google Maps* a partir de las coordenadas geográficas. La prueba se realizó en *R* con la paquetería *ade4*.

D de Tajima y F de Fu y Li

Se calculó la *D* de Tajima y *F* de Fu y Li para detectar señales de expansión poblacional, utilizando DnaSP v6.10.03 (Rozas et al., 2017). Estos valores se calcularon con cada uno de los genes para cada sistema arrecifal. Debido a que no fue posible secuenciar el mismo número de individuos para cada gen, en estos últimos análisis se utilizaron: 22 individuos de cada sistema arrecifal para COI, 32 para 16S y 36 para 28S, es decir, un total de 66, 96 y 108 individuos para cada gen, respectivamente.

Relaciones filogenéticas y distancias genéticas

Se estimó el modelo evolutivo para cada uno de los genes utilizando jModelTest 2.1.9 (Darriba et al., 2012). Posteriormente se obtuvieron relaciones filogenéticas con Máxima Verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés “Maximum likelihood”) e Inferencia Bayesiana (IB). En ambos casos se incluyeron secuencias de los poliplacóforos *I. rissoi* y *Chaetopleura apiculata* mismas que se tomaron de GenBank (Benson et al., 2018). En el caso del análisis de ML se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica G+I y se dio un soporte de las ramas con un Bootstrap de 1,000 repeticiones; para esto se utilizó MEGA 7.0.20 (Kumar et al., 2016).

Para hacer la Inferencia Bayesiana se utilizaron los modelos de evolución obtenidos con jModelTest. Con MrBayes v3.2.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) se simularon 30,000,000 generaciones con dos corridas de cuatro cadenas. Se utilizó un burnin para descartar 25% de los árboles resultantes y se eligió un árbol consenso. Los árboles obtenidos tanto con ML como con IB fueron editados con FigTree v1.4.0 (Rambaut y Drummond, 2017).

Las distancias genéticas se calcularon entre y dentro los clados filogenéticos, así como entre y dentro las poblaciones de los tres sistemas arrecifales. Lo anterior se calculó utilizando cada uno de los genes por separado y con los tres genes concatenados. Los valores se obtuvieron mediante la distancia P, la cual se refiere a la proporción (P) de sitios polimórficos entre secuencias. Ésta se

obtiene dividiendo los nucleótidos diferentes entre el total de sitios comparados (Nei y Kumar, 2000). Tales valores se calcularon utilizando MEGA 7.0.20 (Kumar et al., 2016), y realizando 1,000 repeticiones en las comparaciones.

Para este último análisis uno de los clados filogenéticos se formó de las poblaciones del SAV (*Ischnochiton* sp.). El otro clado se formó de las poblaciones de los ABC y el SAM (*Ischnochiton erythronotus*). Y para hacer estas comparaciones se agregaron otras especies de *Ischnochiton*: *I. australis*, *I. boninensis*, *I. comptus*. Así como otros géneros: *C. apiculata*, *Stenoplax purpurascens*, *Mopalia plumosa* y *Acanthochitona crinita*. Se tomaron secuencias de las especies anteriores disponibles en GenBank para poder realizar las comparaciones. Estas últimas también se calcularon utilizando cada uno de los genes por separado y concatenándolos (Anexos 5 y 6).

RESULTADOS

Se analizaron tres genes, dos mitocondriales (16S y COI) y uno nuclear (28S). El número de individuos secuenciados varió ya que no fue posible amplificar COI para todos los individuos disponibles. Considerando los tres genes se analizó un total de 1442 pb; sin embargo, la diversidad nucleotídica para cada gen fue variable. Se observó una mayor diversidad para COI, presentando el mayor número de haplotipos y sitios polimórficos. Mientras tanto, 28S fue el gen que presentó el menor número de haplotipos y el valor más bajo de diversidad nucleotídica (Tabla 1.2).

Diferenciación genética entre poblaciones

Los valores de F_{ST} más altos se obtuvieron entre sistemas arrecifales, al comparar las poblaciones del SAV con aquellas de los ABC y el SAM, obteniendo valores de entre 0.94 y 0.97 (Anexo 3). Mientras que entre algunas poblaciones de los ABC y el SAM se obtuvieron valores más bajos que los obtenidos dentro de ellos.

Tabla 1.2. Información estadística de los tres genes utilizados en el análisis de las poblaciones del clado de *Ischnochiton erythronotus*. Se muestran los valores de: N- número de secuencias, n- tamaño del gen (pb), S- sitios polimórficos, h- número de haplotipos, k- número promedio de diferencias pareadas, H- Diversidad de haplotipos, Π - Diversidad nucleotídica.

gen	N	n	S	h	k	H	Π
16S	125	512	83	24	30.16	0.88	0.058
COI	86	606	134	32	58.96	0.93	0.097
28S	114	324	7	3	2.98	0.6	0.009

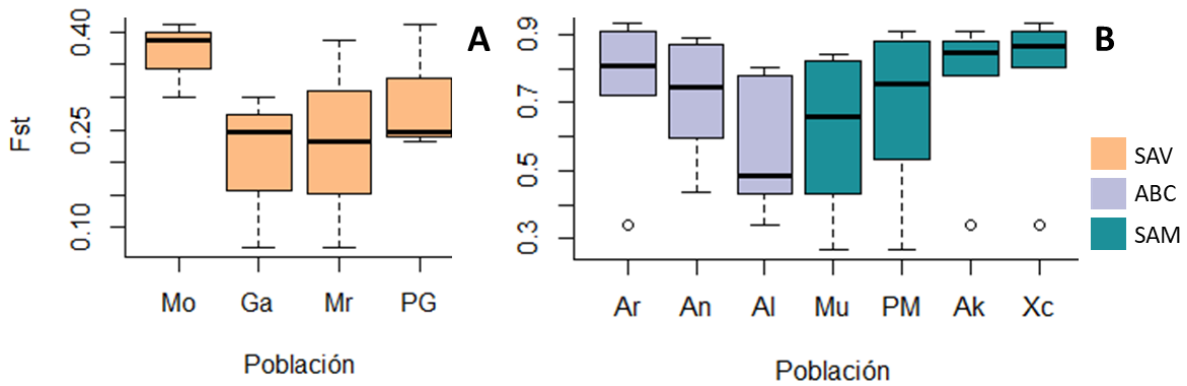


Figura 1.3. F_{st} pareadas para las poblaciones de: A- *Ischnochiton* sp. que se ubican en el SAV; B- *I. erythronotus* ubicadas en los ABC y SAM. Las líneas negras oscuras representan la mediana de los valores para cada población.

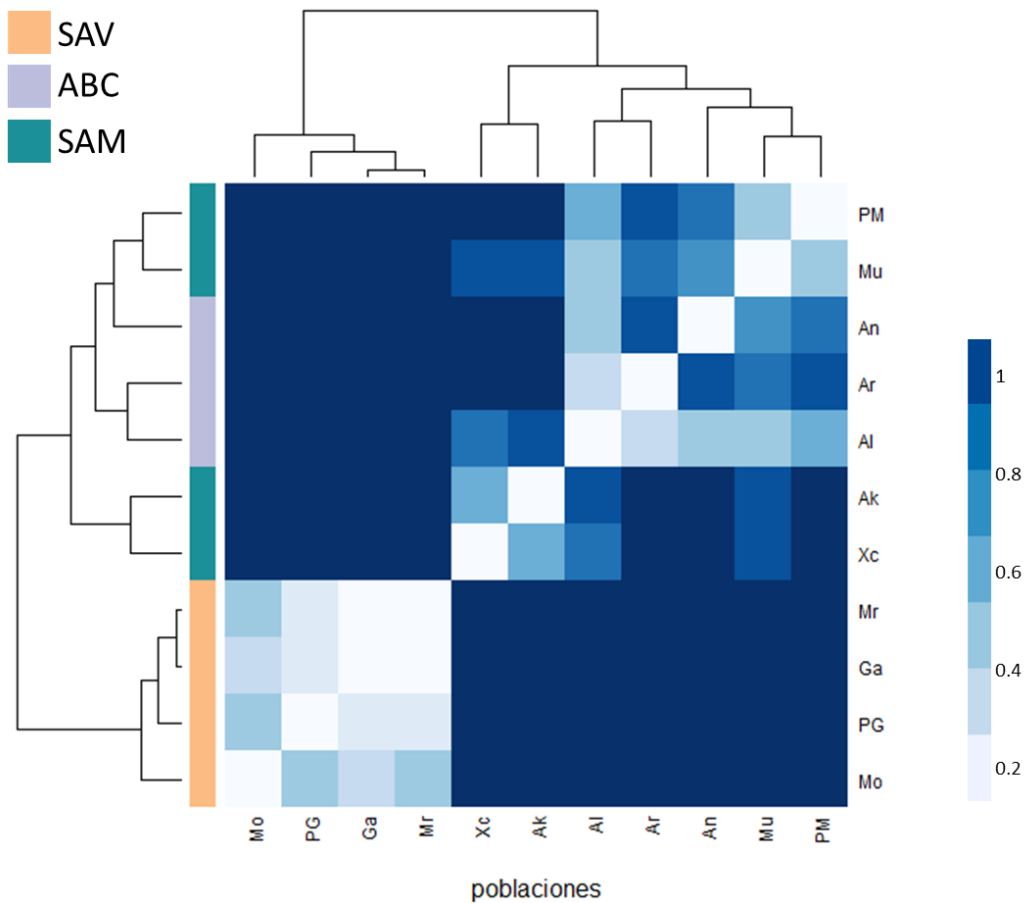


Figura 1.4. Heatmap de los valores pareados de G_{ST} para las poblaciones, representados con los tonos de azul. La barra de colores del costado izquierdo indica a qué sistema arrecifal pertenecen las poblaciones.

Las poblaciones dentro del SAV muestran valores bajos de diferenciación genética, el valor máximo obtenido para F_{ST} fue 0.41 entre Mocambo y La Perla del Golfo (Fig. 1.3A). Entre las poblaciones dentro de los ABC el valor máximo obtenido fue 0.79 entre Cayo Arcas y Cayo

Arenas. Mientras que entre la población del arrecife Alacranes de los ABC y las poblaciones de isla Mujeres y Puerto Morelos ambas ubicadas al norte del SAM, se obtuvo $F_{ST}= 0.43$ y 0.53 , respectivamente.

Entre las poblaciones dentro del SAM, los valores más altos obtenidos fueron entre Puerto Morelos con Akumal, ubicadas al norte y sur de Quintana Roo, respectivamente (Fig. 1.3B)). Es decir, entre arrecifes solo se obtuvieron valores más bajos que dentro de ellos cuando se comparan poblaciones de los ABC y el SAM.

En el mapa de calor graficado con los valores de G_{ST} de cada población se observa que las mayores diferencias existen entre las poblaciones del SAV con las del SAM y los ABC. Sin embargo, también se observan valores cercanos a 1 cuando se comparan Arcas o Alacranes de los ABC con las poblaciones de Akumal o Xcalak ubicadas al sur del SAM (Fig. 1.4).

Tabla 1.3. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de los genes 16S, COI y 28S del clado de *I. erythronotus* en los tres sistemas arrecifales.

Fuente de variación	g.l			Varianza			Porcentaje de Variación		
	16S	COI	28S	16S	COI	28S	16S	COI	28S
Entre sistemas arrecifales	2	2	2	18.70	39.12	2.25	87.03	88.77	94.85
Entre poblaciones dentro de sistemas arrecifales	5	5	7	2.022	3.68	-0.004	9.41	8.37	-0.20
Dentro de poblaciones	72	40	70	0.765	1.26	0.12	3.56	2.86	5.34
Total	79	47	79	21.49	44.07				

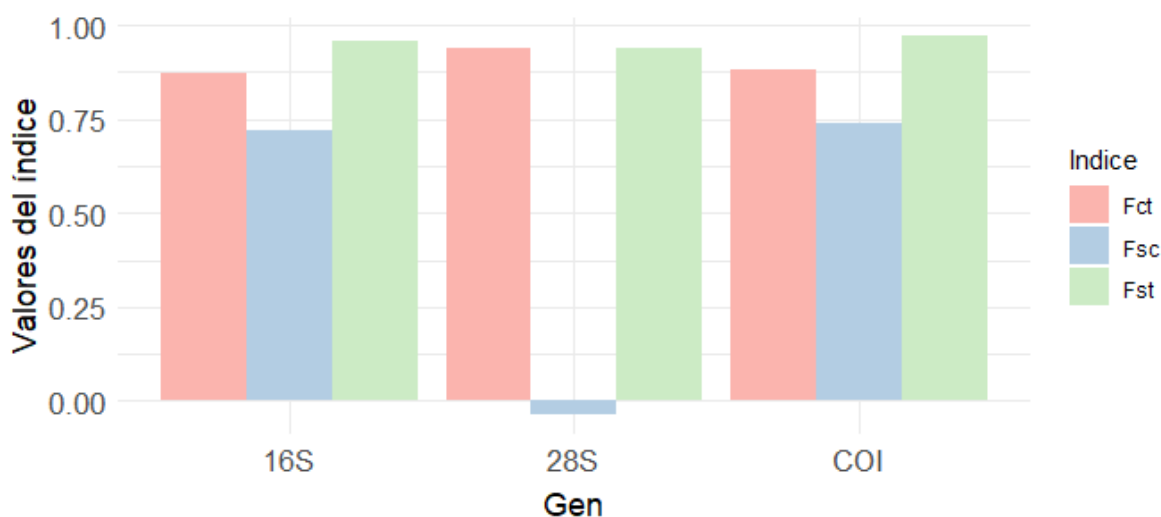


Figura 1.5. Comparación de los índices de fijación de los genes 16S, 28S y COI en el clado de *I. erythronotus*: F_{CT} - entre arrecifes, F_{SC} - entre poblaciones dentro de los arrecifes, F_{ST} - entre poblaciones. Solo los valores de F_{CT} resultaron significativos para todos los genes: 16S $p= 0.003$, 28S $p= 0.001$ y COI $p= 0.003$.

Los valores de varianza molecular obtenidos con AMOVA muestran que el porcentaje mayor de variación existe entre arrecifes. Dentro de los sistemas arrecifales existe mayor variación de 16S entre las poblaciones, mientras que con 28S se observan valores negativos. COI presenta valores de varianza de 39 entre los sistemas arrecifales, con este gen también se obtuvieron los valores más bajos de varianza entre las poblaciones dentro de los sistemas arrecifales (Tabla 1.3).

Los valores de diferenciación genética entre sistemas arrecifales son similares para los tres genes y pasa lo mismo cuando se observan los valores entre las poblaciones. Sin embargo, entre poblaciones dentro de los sistemas arrecifales, 28S indica que las poblaciones son similares genéticamente, pues se observan valores negativos (Figura 1.5).

Estructura genética de las poblaciones

Los resultados de asignación de ancestría $K=3$ obtenidos con Structure, muestran que el SAV forma un grupo genético distinto a los otros dos sistemas arrecifales (Fig. 1.6). El mismo análisis realizado solo para las poblaciones de los ABC y el SAM con $K=3$ y 4, siempre asigna a un grupo genético las poblaciones Ak y Xc, ambas ubicadas al sur de Quintana Roo en el SAM. El resto de las poblaciones del SAM en ambos casos ($K=3$ y 4) comparten ancestría con las poblaciones de los ABC (Fig. 1.7).

La ancestría asignada para las poblaciones coincide con su ubicación geográfica. Las poblaciones que comparten ancestría son las de los ABC con las poblaciones del norte del SAM. Sin embargo, las poblaciones del SAV y las del sur del SAM en todos los casos fueron asignadas a un grupo independiente (Fig. 1.8).

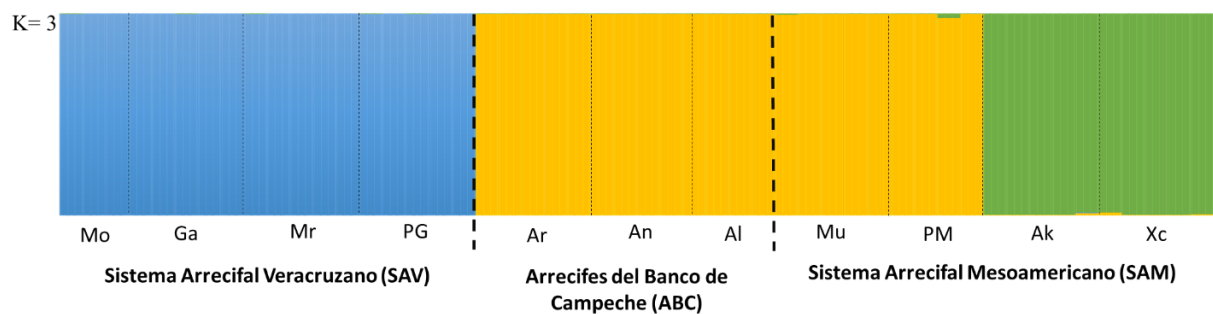


Figura 1.6. Probabilidades de ancestría asignadas con Structure para los individuos del clado de *I. erythronotus* de los tres sistemas arrecifales: SAV, ABC y SAM, se muestra $K=3$.

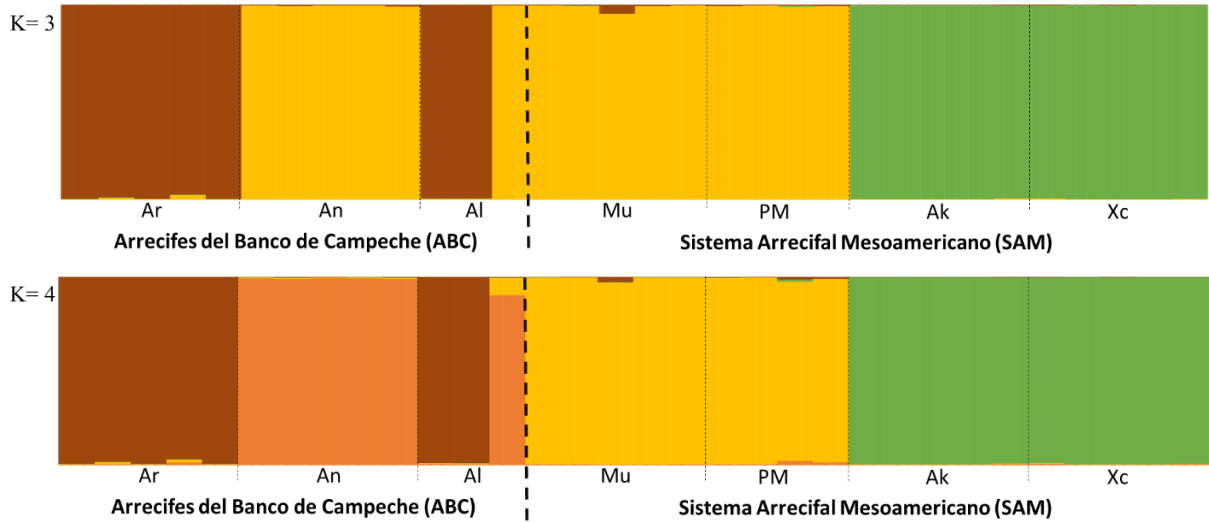


Figura 1.7. Probabilidades de ancestría asignadas con Structure para los individuos de *I. erythronotus* de los ABC y el SAM, se muestra K=3 y K=4 en orden descendente.

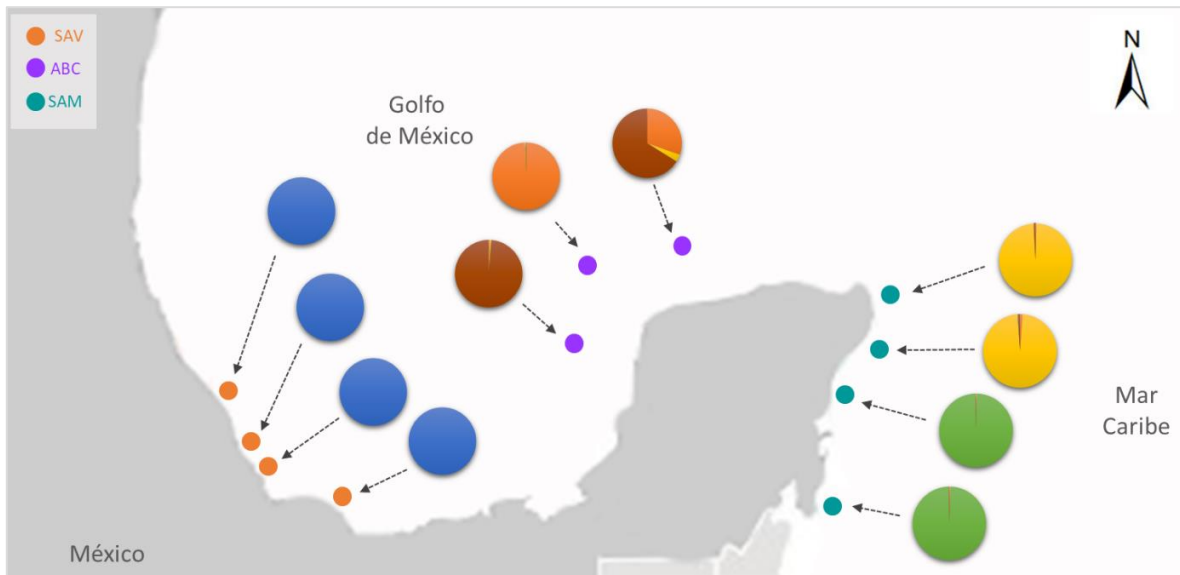


Figura 1.8. Proporción de ancestría para cada población según los resultados consideran cuatro grupos genéticos $K=4$. Los colores de los círculos pequeños representan los diferentes sistemas arrecifales como se indica en el extremo superior izquierdo.

En las redes de haplotipos obtenidas para los tres genes se observan dos grupos. En todos los casos se observó que las poblaciones del SAV no comparten haplotipos con los otros dos sistemas arrecifales. De los 24 haplotipos obtenidos con 16S, cinco de ellos se encuentran en el SAV. Los separan 66 pasos mutacionales de las poblaciones de los ABC y el SAM, tales pasos representan 7.8% de todo el fragmento. Los haplotipos de los ABC y el SAM se encuentran separados por pasos mutacionales sencillos. Solo el haplotipo CM19 se encuentra en Al y AK, poblaciones de los ABC y el SAM, respectivamente (Fig. 1.2A).

En el caso de COI se obtuvieron 32 haplotipos, de los cuales trece se encuentran en el SAV, separados de los otros dos sistemas arrecifales por 105 pasos mutacionales que representan 17.49% del gen. Si bien los haplotipos presentes en los ABC y el SAM se separan por pasos mutacionales sencillos o dobles ninguno de ellos se comparte entre sistemas arrecifales. Inclusive los haplotipos S22-S32, es decir, todos los presentes en el SAM son haplotipos exclusivos de una sola población (Fig. 1.2B).

Con el gen 28S solo se obtuvieron tres haplotipos, el primero de ellos presente en todas las poblaciones del SAV. Los otros dos haplotipos se encuentran en todas las poblaciones tanto de los ABC como del SAM. Estos dos grupos se separan por cinco pasos mutacionales (Fig. 2.1C).

Aislamiento por distancia

La prueba de Mantel para conocer si existe aislamiento por distancia, resultó significativa cuando se compararon las poblaciones de los tres sistemas arrecifales (Anexo 4). Sin embargo, se realizó la misma prueba considerando las poblaciones del SAV en un grupo y un segundo grupo donde se incluyeron las poblaciones de los ABC y el SAM. Evaluando a ambos grupos por separado, los resultados mostraron que no existe una relación entre la distancia geográfica y la distancia genética (Figura 1.8).

D de Tajima y *F* de Fu y Li

Los valores globales que incluyen los tres sistemas arrecifales de la *D* de Tajima y la *F* de Fu y Li para cada uno de los genes, presenta valores similares, ya que todos se encuentran entre 2 y 2.9. En el caso de COI ambos índices presentan valores negativos para el SAV; sin embargo, no son significativos. En los ABC los valores son positivos y sí son significativos. Los valores de los mismos índices con 16S son negativos, pero no significativos en el SAV y los ABC, mientras que en el SAM los valores son positivos, pero solo *D* de Tajima es significativa. En 28S los valores para el SAV no son calculables porque solo existe un haplotipo. En los otros dos sistemas arrecifales los valores de ambos índices son positivos, pero ninguno de ellos es significativo (Tabla 1.4).

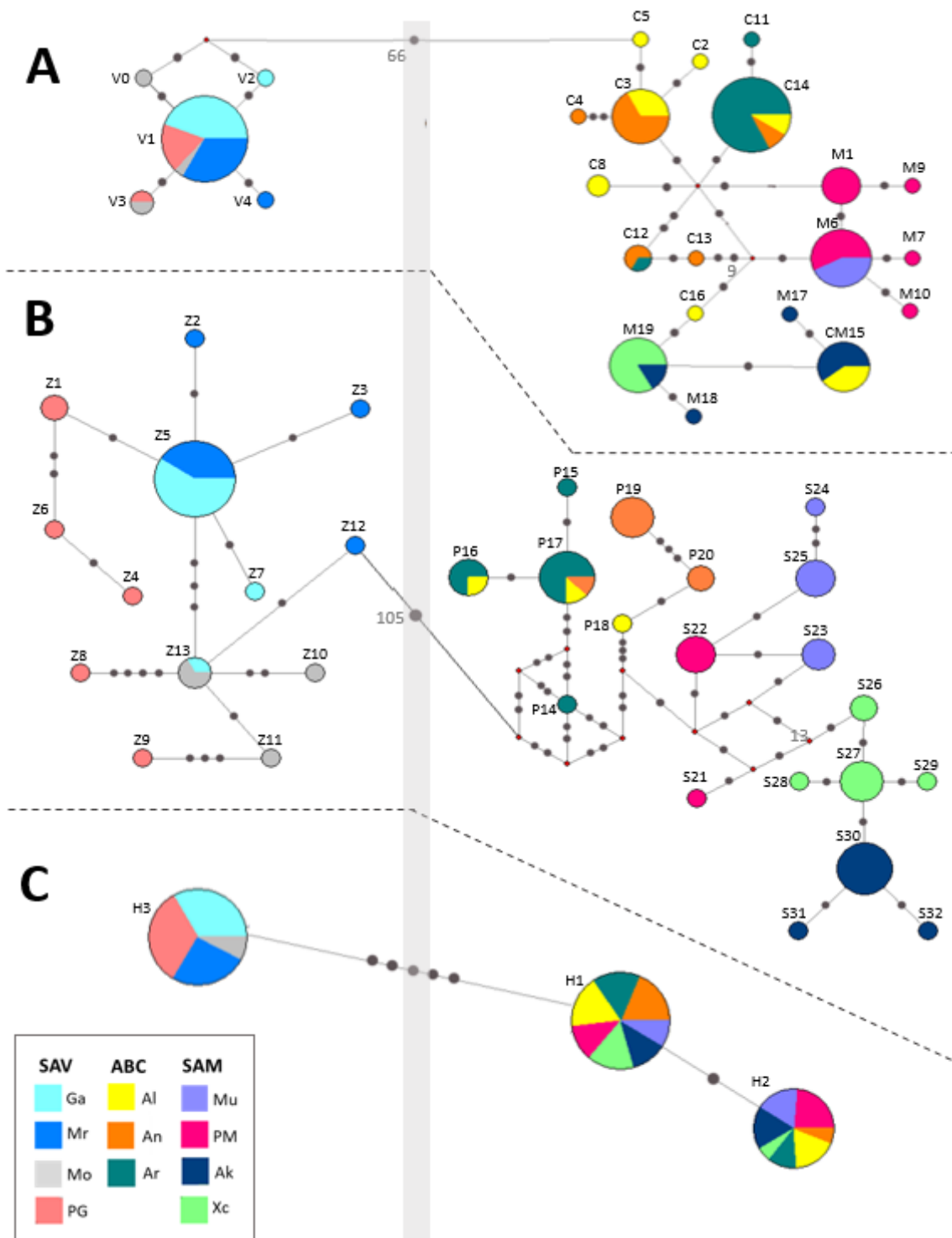


Figura 1.2. Redes de haplotipos del clado de *I. erythronotus*. Las líneas punteadas separan la red de cada gen A-16S, B- COI y C- 28S. Cada círculo de color representa un haplotipo y los colores distinguen las poblaciones. Los puntos negros sobre las ramas marcan los pasos mutacionales entre los haplotipos y los puntos rojos representan los haplotipos que faltan por conocerse y en este caso se grafican como hipotéticos. La barra gris del centro separa los dos grupos formados en todos los casos: a la izquierda de ésta se grafican las poblaciones del SAV, separado por 66, 105 y 5 pasos mutacionales (respectivamente al orden de los genes) de los grupos de los ABC y el SAM, graficados del lado derecho. Las claves al lado de los círculos son los nombres asignados a cada haplotipo.

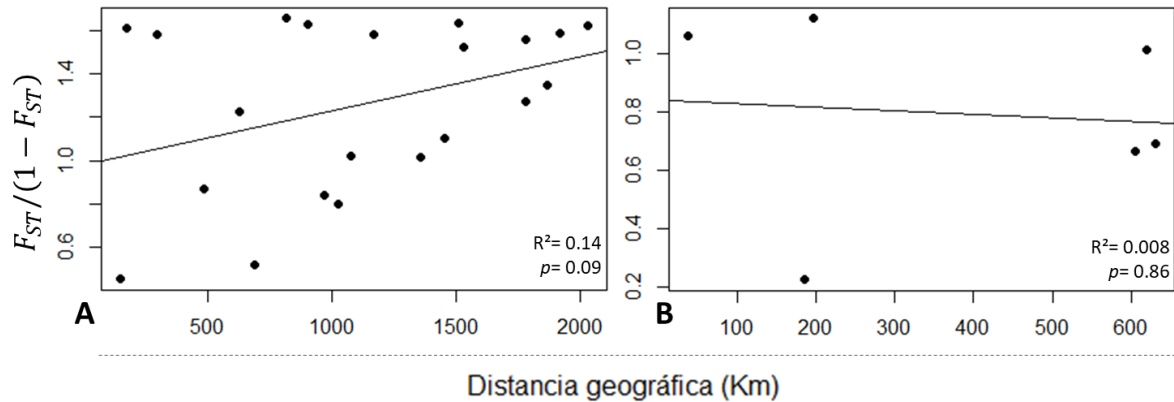


Figura 1.8. Relación entre la distancia genética (F_{ST}) y la distancia geográfica (km) de las poblaciones de: A- *I. erythronotus*, B- *Ischnochiton* sp. Se muestran los valores obtenidos para la regresión (R^2) y el valor de significancia (p).

Tabla 1.4. Valores de la prueba de neutralidad: D de Tajima, y de F de Fu y Li. En ambos casos se incluyen los valores de significancia (p). Los valores se presentan para cada uno de los genes en los tres sistemas arrecifales y un valor global para todas las poblaciones.

	COI			16S			28S		
	SAV	ABC	SAM	SAV	ABC	SAM	SAV	ABC	SAM
D	-0.80	2.13	1.64	-1.74	-0.64	2.25	-----	0.27	1.1
p	>0.10	<0.05	>0.10	>0.10	>0.10	<0.05		>0.10	>0.10
	Global 2.9, $p < 0.01$			Global 2.53, $p < 0.05$			Global 2.8, $p < 0.01$		
F	-1.47	1.98	0.79	-2.25	-0.15	1.43	-----	0.56	0.86
p	>0.10	<0.02	>0.10	>0.10	>0.10	>0.10		>0.10	>0.10
	Global 2.52, $p < 0.02$			Global 2.63, $p < 0.02$			Global 2.06, $p < 0.02$		

Relaciones filogenéticas y distancias genéticas

Según los valores de AICc obtenidos mediante jModelTest el modelo de mutación para los genes mitocondriales fue TIM2+I+G con un valor de $-lnL = 3597.4162$ y para el gen nuclear TIM2+I $-lnL = 653.3404$. En MrBayes estos modelos fueron sustituidos por GTR (Lecocq et al., 2013) y se conservaron I + G. Las reconstrucciones de las relaciones filogenéticas hechas tanto con los genes mitocondriales como con el gen nuclear muestran la misma la topología. En todos los árboles obtenidos las poblaciones del SAV se separan de las demás poblaciones de los otros dos sistemas arrecifales. Los árboles obtenidos con los genes mitocondriales ubican a los individuos de Puerto Morelos (PM) e Isla Mujeres (Mu) en un mismo clado junto con los individuos de los ABC que a las demás poblaciones del SAM dejando en un grupo aparte a los quitones del SAV (Fig. 1.9 y 1.11). En ambos árboles construidos con el gen nuclear los individuos de los ABC y SAM forman un solo grupo diferente al del SAV (Fig 1.10 y 1.12).

Las distancias genéticas entre poblaciones son más altas cuando se comparan al SAV con las poblaciones de los ABC o el SAM. Mientras que las distancias entre las poblaciones de estos dos últimos sistemas arrecifales son más bajas y similares (Tabla 1.5). También se consideró a los

grupos filogenéticos como especies distintas. En este caso la distancia genética entre *Ischnochiton* sp. (quitones del SAV), y *I. erythronotus* (quitones de los ABC y el SAM) es similar a la que se observa entre diferentes especies del género (Tabla 1.6).

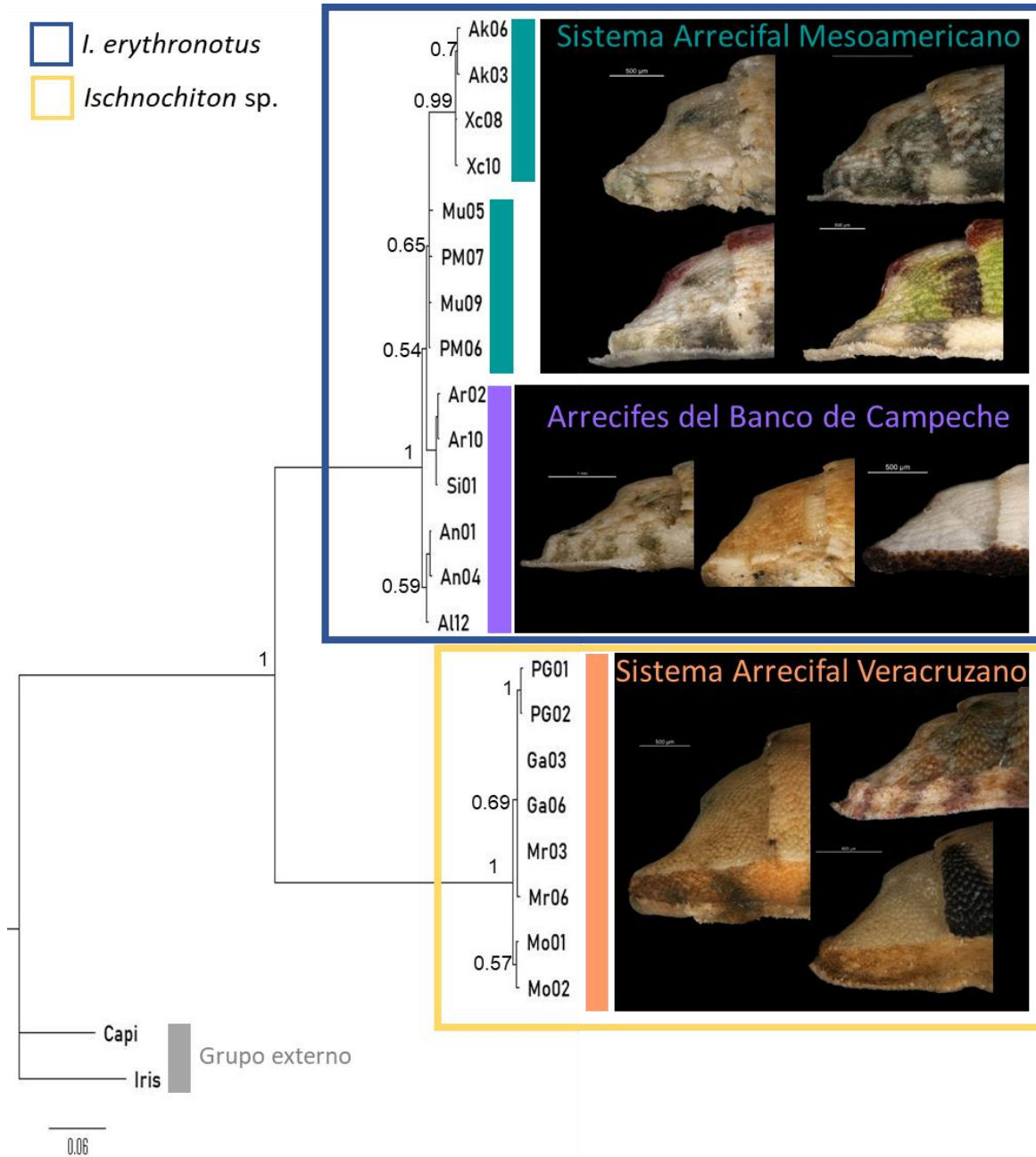


Figura 1.9. Reconstrucción filogenética a partir de inferencia bayesiana del clado de *I. erythronotus* de los tres sistemas arrecifales utilizando los genes mitocondriales COI y 16S, en los nodos se encuentran los valores de *bootstrap*. El grupo externo son los quitones de las especies *I. rissoi* y *C. apiculata*. Se incluyen fotografías de la valva anal en vista lateral para mostrar la pendiente del área posmucronal de los individuos de las poblaciones correspondientes, sin embargo, no se trata de estructuras morfológicas relacionadas con los genes en cuestión, solo se presentan como ejemplos.

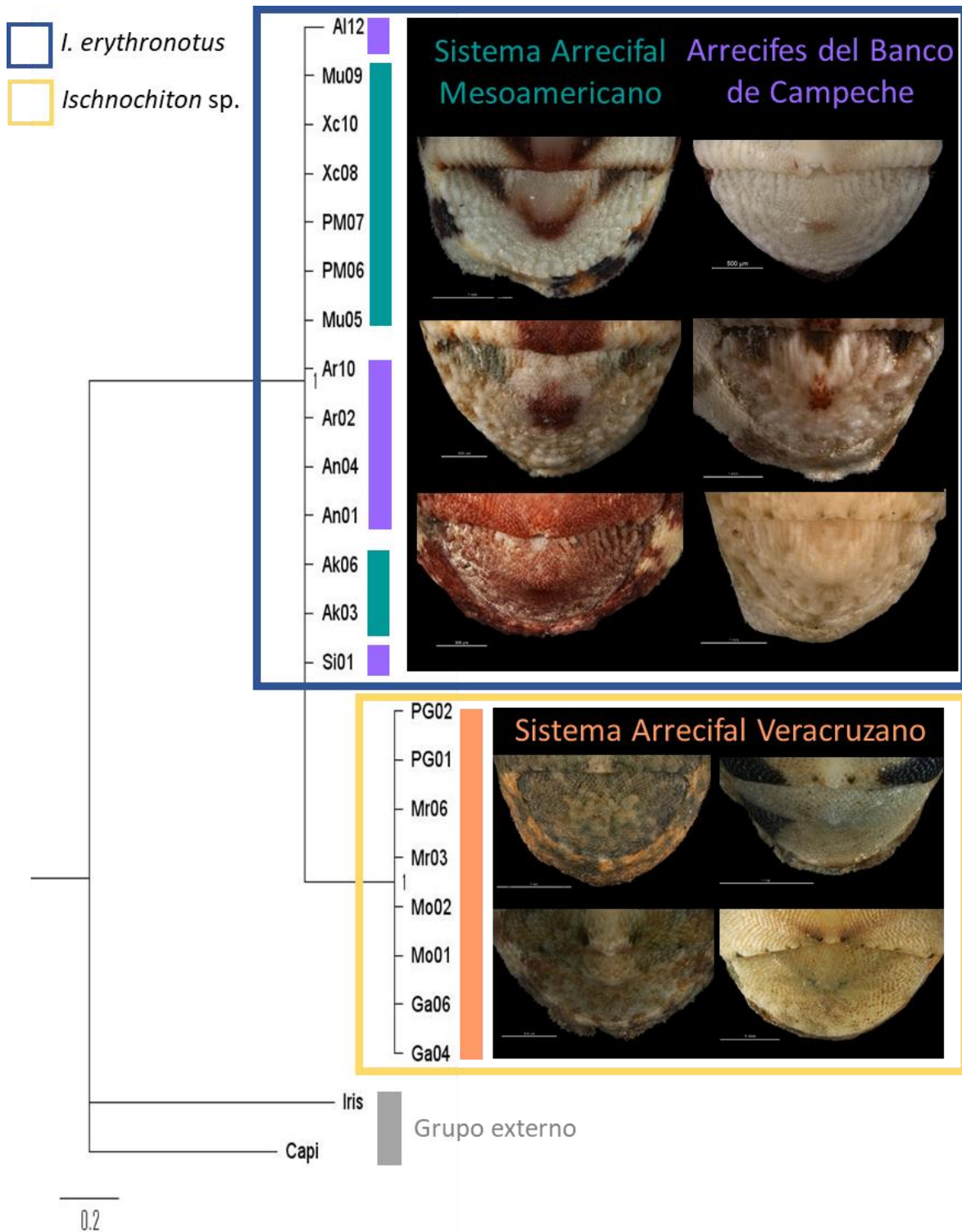


Figura 1.10. Reconstrucción filogenética a partir de inferencia bayesiana del clado de *I. erythronotus* de los tres sistemas arrecifales según el gen nuclear 28S. El grupo externo son los quitones de las especies *I. rissoi* y *C. apiculata*. Se muestran fotografías de la valva anal en vista dorsal de los individuos de las poblaciones correspondientes, sin embargo, no se trata de estructuras morfológicas relacionadas con el gen en cuestión, solo se presentan como ejemplos.

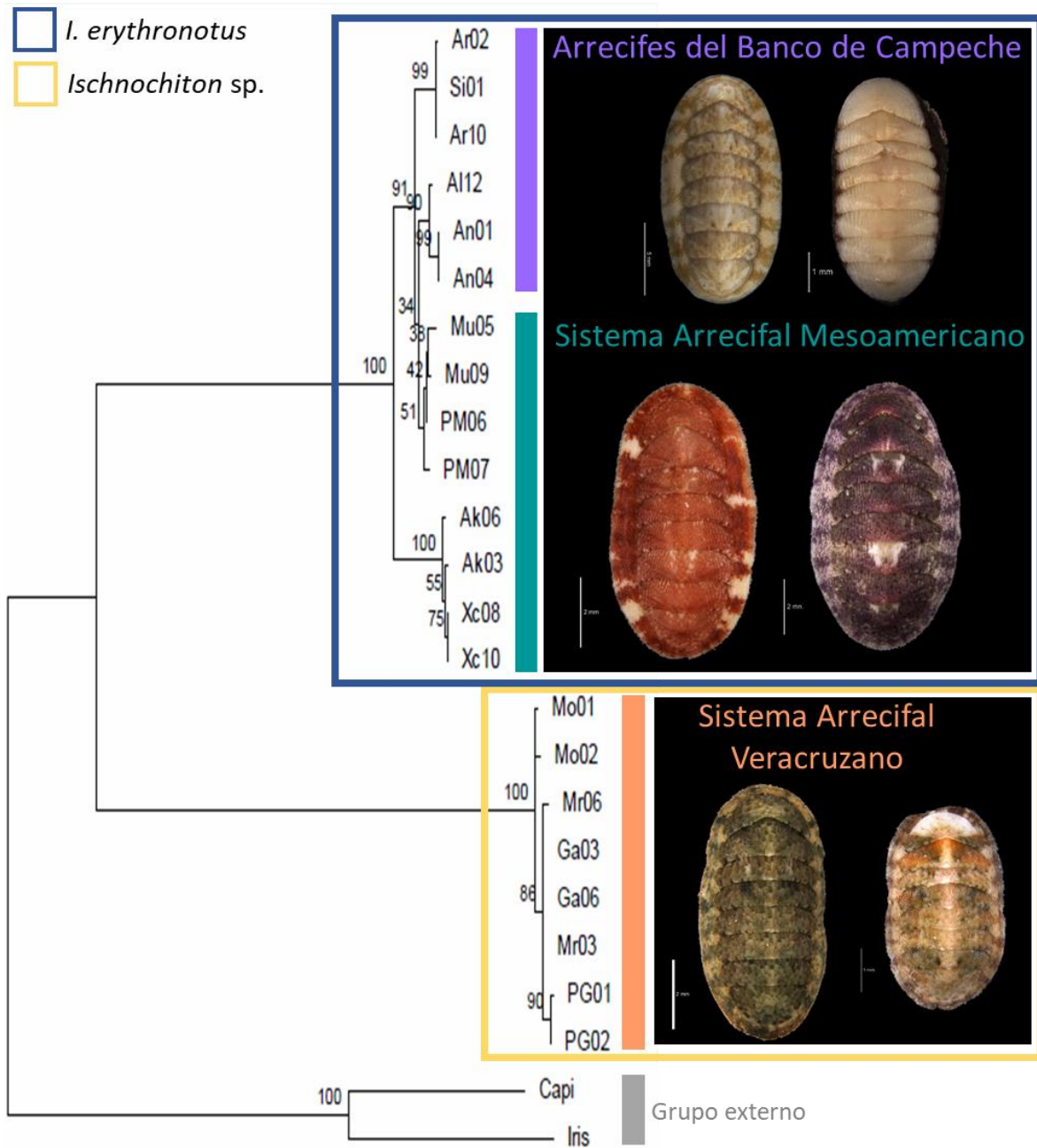


Figura 1.11. Reconstrucción filogenética obtenida con máxima verosimilitud del clado de *I. erythronotus* de los tres sistemas arrecifales según los genes mitocondriales COI y 16S. El grupo externo son los quitones de las especies *I. rissoi* y *C. apiculata*. Se muestran fotografías del cuerpo completo en vista dorsal de los individuos de las poblaciones correspondientes, sin embargo, no se trata de estructuras morfológicas relacionadas con los genes en cuestión, solo se presentan como ejemplos.

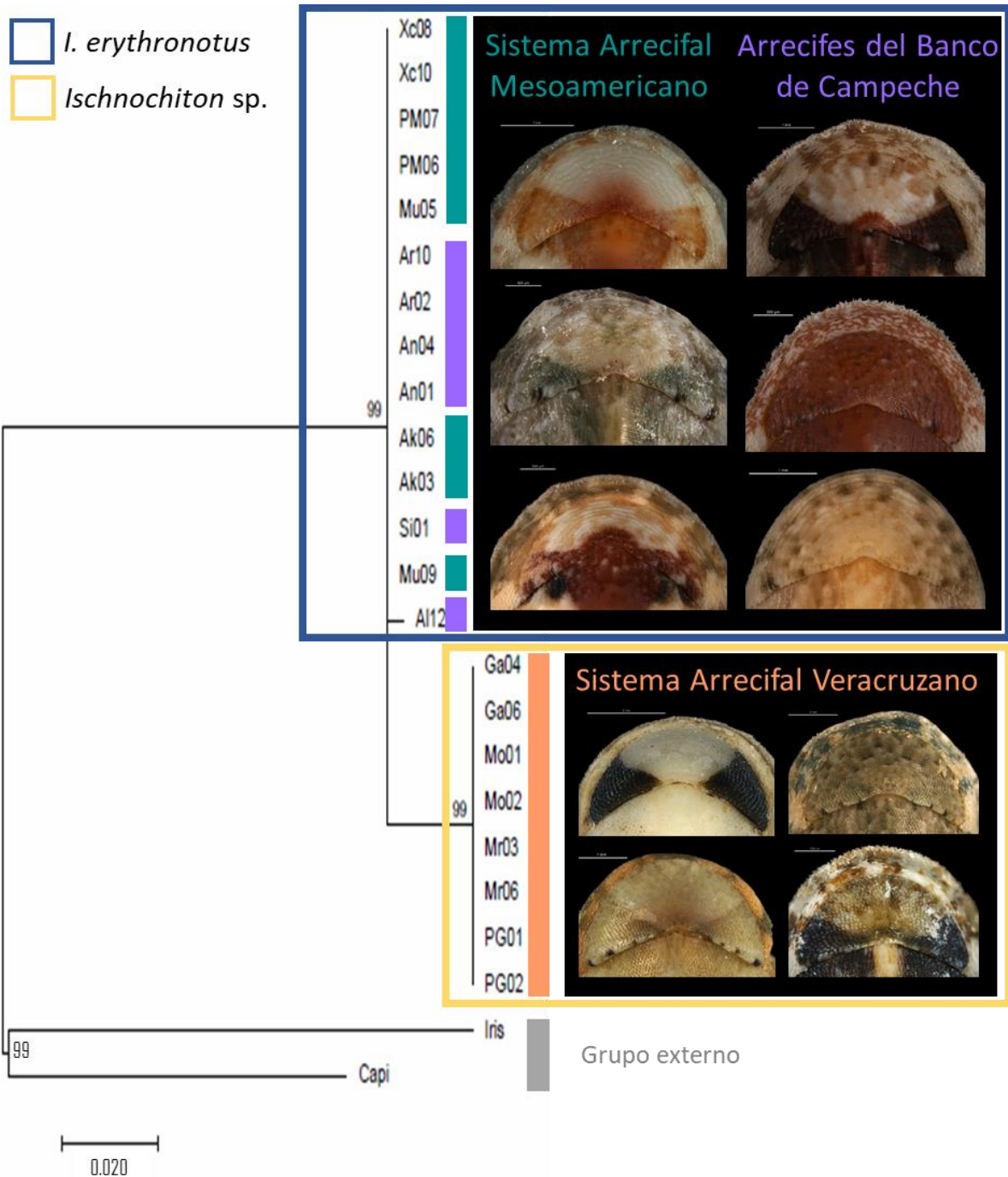


Figura 1.12. Reconstrucción con máxima verosimilitud del clado de *I. erythronotus* de los tres sistemas arrecifales según el gen nuclear 28S. El grupo externo son los quitones de las especies: *I. rissoi* y *C. apiculata*. Se muestran fotografías de los individuos de las poblaciones correspondientes, sin embargo, no se trata de estructuras morfológicas relacionadas con los genes en cuestión, solo se presentan como ejemplos.

Tabla 1.5. Distancia genética entre las poblaciones del clado de *I. erythronotus*. Debajo de la diagonal se encuentran los valores de distancia P y sobre la diagonal los valores de error estándar de tales valores.

		SAV				ABC			SAM			
		Mo	Ga	Mr	PG	Ar	An	Al	Mu	PM	Ak	Xc
SAV	Mocambo	-----	0.001	0.001	0.001	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
	Gallega	0.003	-----	0.001	0.001	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
	Morro	0.003	0.002	-----	0.001	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
	Perla	0.005	0.003	0.003	-----	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
ABC	Arcas	0.126	0.126	0.127	0.128	-----	0.002	0.001	0.002	0.002	0.004	0.004
	Arenas	0.126	0.126	0.127	0.128	0.01	-----	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004
	Alacranes	0.126	0.126	0.127	0.128	0.004	0.008	-----	0.002	0.002	0.004	0.004
SAM	Mujeres	0.128	0.128	0.129	0.130	0.009	0.008	0.009	-----	0.001	0.004	0.004
	Puerto	0.128	0.128	0.129	0.130	0.009	0.007	0.008	0.002	-----	0.004	0.004
	Akumal	0.129	0.128	0.128	0.129	0.025	0.024	0.025	0.021	0.022	-----	0.001
	Xcalak	0.129	0.128	0.128	0.129	0.025	0.023	0.024	0.020	0.020	0.002	-----

Tabla 1.6. Distancia genética entre los grupos de los sistemas arrecifales analizados y otras especies del género *Ischnochiton*. Bajo la diagonal se encuentran los valores de la distancia P y sobre la diagonal la desviación estándar de dichos valores. En las últimas filas se encuentran los valores la distancia P que existe dentro de las especies.

	<i>Ischnochiton</i> sp.	<i>I. erythronotus</i>	<i>I. boninensis</i>	<i>I. comptus</i>
<i>Ischnochiton</i> sp.	-----	0.008	0.01	0.01
<i>I. erythronotus</i>	0.129	-----	0.01	0.01
<i>I. boninensis</i>	0.180	0.173	-----	0.007
<i>I. comptus</i>	0.185	0.174	0.080	-----
Dentro de las especies	0.002	0.017	0.003	0.008

DISCUSIÓN

Estructura genética de las poblaciones

Se sabe que las larvas de los poliplacóforos duran poco tiempo en la columna de agua, limitando la dispersión de los individuos. F_{ST} es un valor que permite evaluar si existe subdivisión entre las poblaciones, ya que cuantifica la frecuencia de alelos entre las poblaciones, $F_{ST}=1$ indica que existe subdivisión entre las poblaciones en cuestión (Nielsen y Slatkin, 2013). En este trabajo los valores más altos obtenidos para $F_{ST}=0.8-0.9$ se obtuvieron al comparar poblaciones entre sistemas arrecifales. La distancia genética más baja dentro de los sistemas arrecifales fue $F_{ST}=0.07$ que, según Nielsen y Slatkin (2013) es un valor que indica diferenciación moderada. De acuerdo con esta guía, cuando se obtienen valores por encima de 0.15 se trata de gran diferenciación genética entre las diferentes poblaciones. Es decir, las poblaciones del clado de *I. erythronotus* presenta diferenciación genética entre sistemas arrecifales. En todos los casos los valores de F_{ST} y G_{ST} varían en el mismo grado de magnitud entre las poblaciones, pero en todos los casos los valores de G_{ST} son más bajos. Cuando hay muchos alelos en un locus dentro de una población, G_{ST} puede ser <1 si hay

alelos que no se comparten en diferentes subpoblaciones (Nei y Kumar, 2000). También los valores obtenidos en el Análisis de Varianza Molecular muestran que la mayor variación genética tanto de los genes mitocondriales como del gen nuclear se encuentra entre los sistemas arrecifales, valores que coinciden con la subdivisión de las poblaciones y por tanto con el flujo de genes entre ellas.

El mar Caribe se conecta al golfo de México y al banco de Campeche por medio del canal de Yucatán. La conexión de estas zonas se ve influenciada por los procesos físicos que, además, permiten la dispersión de larvas (Carrillo et al., 2017). Los resultados de asignación de ancestría de *Structure* mostraron que las poblaciones del SAM efectivamente están conectadas con las poblaciones del banco de Campeche, ya que en la asignación de $k=3$ y 4 las poblaciones del norte de Quintana Roo comparten un grupo genético con las poblaciones de los ABC. No obstante, el flujo de genes no se comparte con las poblaciones del golfo de México que se encuentran formando el SAV, pues tales poblaciones constituyen un grupo completamente distinto. Lo anterior puede ser resultado de los procesos oceanográficos, ya que éstos pueden promover la dispersión larvaria o actuar como barreras que mejoran la retención de larvas, donde por supuesto, influye el ciclo de vida de los organismos (Carrillo et al., 2017). Se sabe bien que los poliplacóforos en estadio larvario permanecen poco tiempo en la columna de agua y que no tienen la capacidad de nadar a voluntad, solo pueden desplazarse verticalmente (Yearsley y Sigwart, 2011).

Aunado a esto, estudios realizados con simulaciones de dispersión de partículas muestran que solo alrededor del 1% de éstas llegan del Mar Caribe pasando por el banco de Campeche y pasan al norte del Golfo de México a través de la corriente de Lazo llegando hasta Florida en Estados Unidos (Johnson et al., 2013). Por tanto, es probable que tales partículas no lleguen al oeste del golfo de México, y en este caso, se interrumpe el flujo de genes de los quitones de los ABC con el SAV. Las redes de haplotipos mostraron que efectivamente no existe ningún grupo genético en los ABC o el SAM que también se encuentre en el SAV. Inclusive existen haplotipos únicos en las poblaciones, lo que explica por qué se obtuvieron valores altos en los índices de diferenciación poblacional. Si bien los índices de fijación son un indicador de la diferenciación genética poblacional, Nei y Kumar (2000) recomiendan acompañar estos resultados de análisis filogenéticos para obtener información de posible aislamiento o historia genealógica, lo cual se discutirá más adelante.

Con las redes de haplotipos reconstruyeron dos grupos en todos los casos. Con los genes COI y 16 S, los grupos se separaron por 66 y 105 pasos mutacionales respectivamente. Este resultado es consistente con los obtenidos en otros trabajos de quitones. Okusu (2013), encontró 64 haplotipos para COI en 108 individuos, de cuatro especies de *Ischnochiton*. Utilizando haplotipos, las especies se separaban por 56 a 69 pasos mutacionales. Si bien en el trabajo de Okusu (2013)

existen menos pasos mutacionales entre las especies, las poblaciones de éstas comparten la misma distribución geográfica y no es así en las poblaciones de los dos grupos formados en el clado de *I. erythronotus* analizadas en este trabajo. Estos valores para COI cambian en otros grupos de moluscos. Mikkelsen y Todt (2018), en tres clados de una especie de Caudofoveata formados por su distribución geográfica, encontraron once haplotipos de COI en 51 individuos; los clados formados se separaban por 31 pasos mutacionales que representaban 5.4% de todo el gen. Con 16S, estos autores encontraron ocho haplotipos separando los clados por cinco pasos mutacionales. Aunque el número de haplotipos es diferente para los dos genes, ambos reconstruyeron la misma topología entre los clados en este último trabajo. Y de igual manera, la diversidad de haplotipos entre genes es distinta en el clado de *I. erythronotus*, pero la topología reconstruida es la misma con cada uno de los genes.

Los individuos del clado de *I. erythronotus* presentan hábitos crípticos, pues se encuentran viviendo bajo rocas cerca de arrecifes coralinos y otras áreas rocosas. No obstante, el trabajo de Liversage y Benkendorff (2017) muestra que algunos quitones del género *Ischonochiton* presentan altas actividades durante la noche logrando desplazarse entre pequeños parches rocosos. Sin embargo, la capacidad de dispersión de los adultos es prácticamente nula, siendo mucho más importante la dispersión que pueden tener en el estadio larvario (Wares et al., 2001). Los resultados tanto de asignación de ancestría como las redes de haplotipos mostraron estructura genética entre los arrecifes. Ya que si bien, la dispersión de las larvas depende casi en su totalidad de las corrientes marinas, las larvas de los quitones son lecitotróficas, es decir, solo se desarrollan utilizando las reservas del vitelo del huevo. Por lo anterior, solo pueden permanecer en la columna de agua alrededor de un par de horas (García-Ríos et al., 2014). En este caso, se observó que solo las poblaciones más cercanas geográficamente presentan un flujo genético mayor entre sí y se sabe que esto es señal de la organización que presentan las especies costeras (Hellberg et al., 2002). No obstante, la prueba de Mantel para cada grupo del clado, mostró que no existe aislamiento genético ocasionado por la distancia entre las poblaciones. Para que exista aislamiento por distancia, la diferenciación genética debe ser gradual en la distancia geográfica (Hedrick, 2011). Probablemente incluyendo poblaciones de *I. erythronotus* de otras zonas del mar Caribe, se obtendrían resultados significativos para esta prueba.

La teoría neutral supone que todas las mutaciones son neutrales, para evaluarla se utilizaron los índices de D de Tajima (1989) y F de Fu y Li (1993), los cuales permiten evaluar si las poblaciones han pasado por eventos como cuellos de botella o expansión poblacional (Nielsen y Slatkin, 2013). Los valores negativos en la D de Tajima se presentan cuando las poblaciones han pasado por una expansión poblacional (Tajima, 1989). En este caso, aunque se obtuvieron valores

negativos para algunos de los sistemas arrecifales ninguno de ellos resultó ser significativo, lo que indica que las poblaciones se encuentran en equilibrio demográfico. Solo los ABC presentaron valores positivos de D de Tajima y F de Fu y Li que resultaron significativos para COI, lo que indica que este gen en esas poblaciones ha presentado selección balanceadora. Es el mismo caso para el SAM según los valores obtenidos en la D de Tajima con COI, que al presentar valores significativos también supone que en las poblaciones ha ocurrido selección balanceadora.

Reconstrucción filogenética en el clado de *I. erythronotus*

La divergencia de COI ha resultado una herramienta eficiente en la identificación de especies (Hebert et al., 2003). En este estudio tanto el análisis de inferencia bayesiana y como el de máxima verosimilitud, reconstruyeron la misma relación entre los individuos de los diferentes arrecifes. En todos los casos, las poblaciones consideradas como *Ischnochiton* sp. se separan de *Ischnochiton erythronotus* como un grupo completamente diferente, apoyado con valores de bootstrap de 1 y 100%, respectivamente. En los trabajos previos, Polyplacophora siempre aparece como un grupo monofilético (Okusu et al., 2003), y en este caso la relación obtenida es confiable pues además se trata de dos especies del mismo género.

Las distancias genéticas en Polyplacophora son mayores que las reportadas para otros grupos de moluscos (Bonfitto et al., 2011; Mikkelsen y Todt, 2018). Entre especies de quitones la distancia P reportada con COI se encuentra entre 11-18% (Bonfitto et al., 2011; García- Ríos et al., 2014). En este estudio la distancia entre *I. erythronotus* e *Ischnochiton* sp. con COI fue de 19% y con los tres genes concatenados fue de 12%. Sí bien es un valor más bajo, también se encuentra entre el intervalo reportado entre especies. La distancia genética entre diferentes especies es más grande que entre diferentes poblaciones dentro de las especies y por supuesto que entre subespecies (Nei, 1975). Gracias a las secuencias disponibles que existen en *GenBank* fue posible hacer la comparación de la distancia que existe entre los grupos incluidos en el este estudio con otras especies del género. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los intervalos reportados para quitones. Solo se obtuvieron valores mayores a 20% utilizando COI entre especies de *Ischnochiton* con otras especies de los géneros *Acanthochitona* y *Mopalia*. Los datos anteriores muestran que *Ischnochiton* sp. genéticamente se encuentran separada de *I. erythronotus* al igual que de otras especies de quitones. Si bien se trata de especies cercanas, se sabe que la distancia entre especies hermanas es igual a la que existe entre especies relacionadas que no necesariamente son especies hermanas (Nei, 1975). En los organismos marinos con fecundación externa, el aislamiento reproductivo puede favorecerse por la tolerancia al ambiente y compatibilidad de los gametos (Palumbi, 1994). Sin embargo, estos grupos no comparten distribución geográfica, pero se ha

propuesto que la divergencia entre clados del Golfo de México y el Atlántico ocurrió en el Pleistoceno hace aproximadamente 0.8 Ma (Galván-Quesada et al., 2016).

CONCLUSIONES

No existe flujo génico entre los arrecifes del banco de Campeche (ABC) y el Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM) con el SAV, es decir, este último está aislado genéticamente de los dos primeros.

Existe flujo genético en los ABC y el norte del SAM, sin embargo, no existe aislamiento por distancia entre las poblaciones de ambos arrecifes, ya que la diferenciación en las poblaciones no es gradual entre estas.

La distancia genética que existe entre *Ischnochiton* sp. e *I. erythronotus* es igual que la que existe y que se ha reportado para especies diferentes de poliplacóforos, lo cual es un indicador de que no se trata solo de alta diversidad genética dentro de una especie, sino de especies diferentes.

Si bien es cierto que el Sistema Arrecifal Veracruzano al formar una especie diferente a *I. erythronotus* no podría presentar intercambio genético con las poblaciones de los arrecifes del banco de Campeche ni con el Sistema Arrecifal Mesoamericano, también es cierto que estos dos grupos tampoco comparten distribución geográfica. Por lo que estos dos grupos han permanecido aislados debido a las corrientes marinas u otros factores oceanográficos.

Los datos de tres genes indican que las poblaciones de Veracruz constituyen una especie diferente a *I. erythronotus* que se encuentra en los arrecifes del banco de Campeche y el Sistema Arrecifal Mesoamericano. Sin embargo, a simple vista ambas especies son difíciles de distinguir, por lo que en el siguiente capítulo se incluye un análisis de morfometría geométrica y el acercamiento de las estructuras duras de los quitones en cuestión.

CAPÍTULO II

Morfometría geométrica del clado de *Ischnochiton erythronotus* (Adams, 1845) (Mollusca: Polyplacophora) en el Golfo de México y mar Caribe.

INTRODUCCIÓN

La forma según Kendall (1977) es toda la información geométrica que resulta de filtrar de un objeto los efectos de la posición, escala y rotación. Biológicamente, la diferencia en la forma de los organismos puede deberse a la diferencia en los procesos de crecimiento o a la diferencia en la respuesta a las presiones de selección (Zelditch et al., 2012). La morfometría geométrica permite evaluar cuantitativamente la variación de la forma con otras variables (Rohlf, 1990). La representación de la forma se realiza a través de *landmarks* o *semilandmarks*. Los *landmarks* son puntos homólogos, es decir, son puntos anatómicamente reconocibles en todos los individuos; mientras que los *semilandmarks* son puntos espaciados que se encuentran entre dos puntos homólogos. Los *semilandmarks* suelen emplearse para representar curvaturas en el cuerpo de los organismos, por lo que su ubicación y número es arbitraria (Zelditch et al., 2012; Yazdi, 2014).

Además, la morfometría geométrica permite evaluar la covariación existente con otras variables sin discriminar del todo la talla de los organismos, mediante la alometría (David y Laurin, 1996). El crecimiento alométrico se define como el cambio en la forma debido al tamaño (Klingenberg, 2010). Los patrones de variación o covariación de la forma de los caracteres entre individuos de la misma población se refieren a alometría ontogenética; mientras que la alometría

evolutiva hace referencia a la covariación de entre individuos de diferentes linajes que comparten un ancestro en común (Cock, 1966; Klingenberg y Zimmermann, 1992).

Los quitones se caracterizan por presentar un cuerpo aplanado dorsoventralmente y una concha dividida en ocho placas de aragonita que se enumeran de I-VIII, según la posición anteroposterior que ocupan (Kass y Van Belle, 1987; Todt et al., 2008; García-Ríos, 2003). Por su posición, las placas también llamadas valvas, reciben el nombre de: valva cefálica (valva I), valvas intermedias (valvas II-VII) y valva anal (valva VIII). Estas valvas, además se encuentran imbricadas por un cinturón, el cual es carnoso, flexible y presenta estructuras calcáreas en forma de escamas, cerdas o espículas (Kass y Van Belle, 1987; García-Ríos, 2003).

Las valvas en la zona ventral presentan una capa interna llamada articulamento, que se extiende debajo de cada valva (II-VIII) hacia la valva anterior; se trata de láminas suturales que reciben el nombre de apófisis y que permiten la unión de las placas. Estas extensiones del articulamento también están presentes en las zonas laterales de todas las valvas, permitiendo el anclaje de las valvas con el cinturón. Se conocen como placas de inserción y la mayoría de las veces presentan muescas llamadas hendiduras de inserción (Figura 2.1). Estas últimas, varían en número y se utilizan para reconocer grupos taxonómicos dentro de Polyplacophora (García-Ríos, 2003).

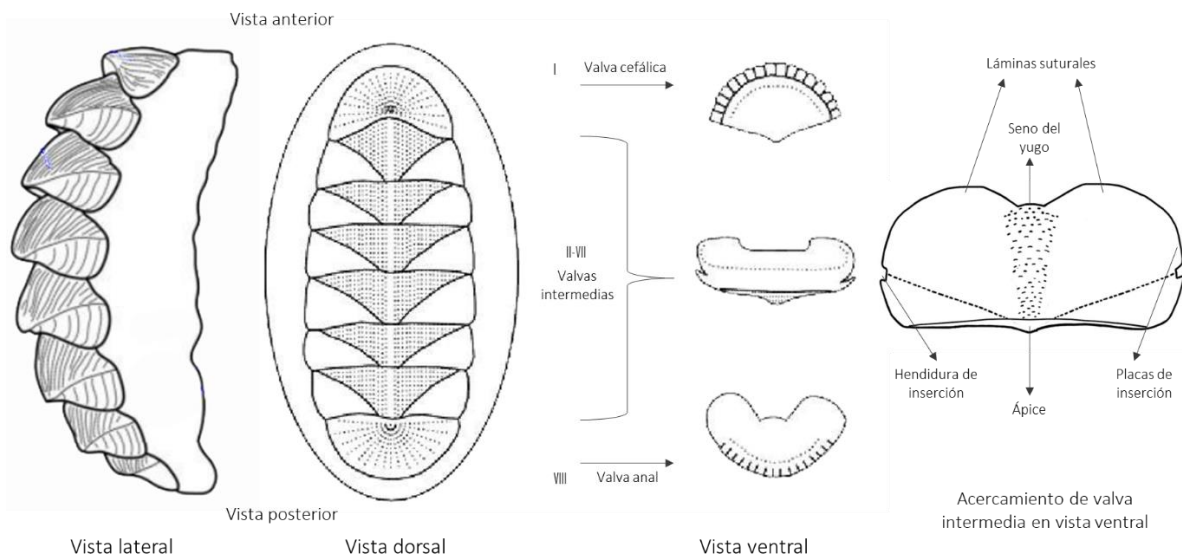


Figura 2.1. Anatomía de la concha de un quitón en vista lateral. Vista dorsal: se muestra la disposición de las ocho valvas respecto al cinturón y a la posición del cuerpo. Vista ventral: se muestra cómo se extiende el articulamento alrededor de las valvas según la posición (anteroposterior) que ocupan. En el caso de la valva cefálica se observan pequeñas muescas en la parte posterior que representan las hendiduras de inserción, en el caso de la valva anal dichas hendiduras se muestran en la parte posterior de la valva, y en las zonas laterales en el caso de la valva intermedia. En el acercamiento de la valva intermedia además se observan cicatrices musculares que se extienden desde la zona intermedia hasta las zonas laterales, donde se encuentran las hendiduras de inserción. Fotografía tomada de David et al. (2016) y modificada.

En la zona ventral de la concha está presente una capa que recibe el nombre de tegumento. El patrón en la ornamentación presente en esta capa varía entre las zonas de las valvas: la valva cefálica (I), las áreas laterales de las valvas intermedias (II-VII) y la zona posmucronal de la valva anal (VIII) suelen presentar la misma ornamentación, diferenciándose porque en las valvas cefálica y anal la ornamentación suele tener una disposición concéntrica, es decir, la ornamentación tiene un orden paralelo al perímetro de las valvas. En las áreas laterales de las valvas intermedias la ornamentación presenta una disposición longitudinal, la mayoría de las veces. Las áreas centrales de las valvas intermedias y el área premucronal de la valva anal comparten otra ornamentación; mientras que el área del yugo en las valvas intermedias, presentan una ornamentación distinta a las áreas antes mencionadas. (Figura 2.2). A su vez, el tegumento posee canales que se observan como poros en la superficie de la concha; reciben el nombre de estetos (megaloestetos o microestetos, según su tamaño), y se han considerado como ocelos (ojos) ya que son “órganos” fotosensibles (Eernisse, 2007; Eernisse et al., 2007; Fernandez et al., 2007; Liuzzi, 2014).

Tanto las valvas, la rádula y las estructuras calcáreas del cinturón, son estructuras duras. Éstas han sido utilizadas para crear sistemas de clasificación de los polioplacóforos, como los propuestos por Kaas y Van Belle (1985, 1987, 1990) y Lyons (1988). Algunas claves de identificación (Kaas y Van Belle, 1985a, 1985b, 1987, 1990, 1994; Lyons, 1988; Redfern, 2001; García-Ríos, 2003; Redfern, 2013) además incluyen: características del ángulo formado por las valvas cefálica y anal (ej. en forma de “V”); la posición del mucrón (anterior, central o posterior) en la valva anal; la prominencia de “la parte media de las valvas intermedias” o del mucrón observado en vista lateral. Incluso, se han utilizado algunos caracteres de las partes blandas, como son la disposición y el número de branquias.

Ischnochiton erythronotus presenta variación en el color del tegumento y del cinturón. Puede ser crema, gris, verde, azul, morada y a veces con manchas negras o rojas. Presenta ornamentación muy marcada, con cordones radiales en la valva cefálica y en el área posmucronal. Dichos cordones se extienden en las zonas laterales donde se presentan de longitudinalmente en las valvas intermedias y se desvanecen hacia el área del yugo (Kaas y Van Belle 1985a; García-Ríos, 2003).

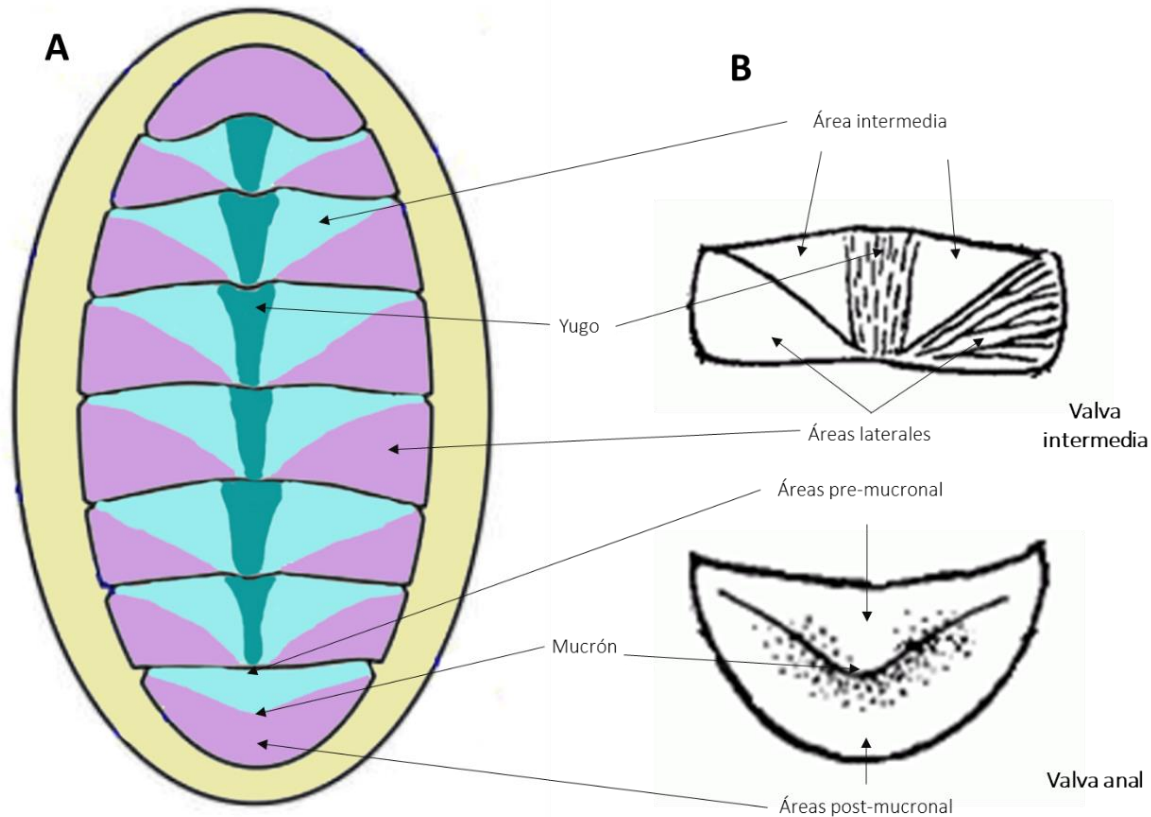


Figura 2.2. Disposición de la escultura del tegumento en las conchas de quitones A. Se observa con colores distintos la escultura del tegumento. La valva cefálica, las áreas laterales de las valvas intermedias y el área posmucronal de la valva anal comparten la misma ornamentación, en este caso se representa con morado. El área central de las valvas intermedias y el área pre-mucronal están representadas con verde ya que estas zonas comparten la misma ornamentación, sin embargo, en algunos casos el área del yugo tiene una ornamentación distinta y por eso se representa con un color verde oscuro. B. Se observa un acercamiento de las áreas en que se dividen las valvas intermedias y la valva anal. En esta última se representa un mucrón, estructura que marca la división entre el área pre y posmucronal.

ANTECEDENTES

Se han llevado a cabo una serie de estudios de riqueza específica de los poliplacóforos, entre los cuales podemos citar: García-Ríos (2003), Reyes-Gómez (2003), Gracia et al. (2005), García-Ríos y Álvarez Ruíz (2011), Reyes-Gómez et al. (2017). Estos autores reportan a *I. erythronotus* en las costas del mar Caribe. No obstante, sólo García-Ríos (2003) y Reyes-Gómez et al. (2017) han presentado fotografías tomadas con microscopía electrónica de barrido en las que se detalla la morfología de la especie. Si bien incluir fotografías de la escultura fina de las valvas de los quitones se ha utilizado mucho en la sistemática del grupo, también existen técnicas como la morfometría geométrica que ha sido empleada en otros grupos de moluscos como los que se mencionan a continuación.

Connors et al. (2012) evaluaron la estructura tridimensional de la forma de las valvas del quitón *Tonicella marmorea*, concluyendo que el “enrollamiento” dado por la interconexión de las valvas da movilidad y provee defensa a los individuos. Patiño-Montoya y Abella-Medina (2017) evaluaron la morfometría de *Chiton stokesii* en diferentes gradientes intermareales; obtuvieron una alometría significativa en la relación largo y ancho del cuerpo, pero no hubo relación de la forma con el gradiente intermareal.

Los trabajos de morfometría geométrica enfocados a moluscos se han llevado a cabo en su mayoría con caracoles y algunos bivalvos. Rufino et al. (2006) utilizaron morfometría geométrica para distinguir a dos especies de bivalvos del género *Chamelea*. Cruz et al. (2012) lograron detectar diferencias interespecíficas en dos especies piscívoras del género *Conus*, utilizando morfometría geométrica. Vaux et al. (2017) evaluaron la forma del sifón del caracol *Penion chathamensis* entre hembras y machos, aunque no hubo diferencias entre sexos, resultó un buen carácter para distinguirla de otra especie del género.

HIPÓTESIS

Las diferencias genéticas observadas con dos mitocondriales y uno nuclear mostraron que los quitones del clado de *I. erythronotus* que se encuentran en el golfo de México en el SAV pertenecen a una especie distinta, también es una especie del género *Ischnochiton*, pero no se trata de *I. erythronotus*, aunque sí una especie cercana. Debido a que morfológicamente *Ischnochiton* sp. es muy parecida a *I. erythronotus*, se espera que utilizando morfometría geométrica sea posible observar diferencias en algunos caracteres de las valvas de la concha de los individuos de ambos clados.

JUSTIFICACIÓN

La morfometría geométrica es una técnica que permite evaluar las diferencias morfológicas cuantitativamente. Los moluscos son un buen modelo de estudio para evaluar mediante dicha técnica, debido a que poseen estructuras duras, pues facilita la toma de fotografías e identificación de puntos homólogos. Sin embargo, existen pocos trabajos con quitones, siendo los gasterópodos los más estudiados con morfometría geométrica. Además, la mayoría de los caracteres utilizados para identificar las especies de quitones son estructuras muy finas y/o pequeñas, difíciles de ver a simple vista y casi imposibles diferenciar en campo. Por lo anterior la morfometría geométrica puede ser una buena manera de reconocer estructuras que permitan la identificación de las distintas especies de quitones.

OBJETIVOS

General

- Diferenciar a los individuos de *Ischnochiton* sp. de *I. erythronotus*, utilizando morfometría geométrica, identificando variaciones en las estructuras de las valvas que forman la concha.

Particulares

- Determinar si existen estructuras de la concha que permitan diferenciar los individuos del clado de *I. erythronotus*, y si esta diferenciación existe entre los individuos de los distintos sistemas arrecifales.
- Reconocer cuál es el carácter que proporciona más información en la diferenciación de los individuos del clado de *I. erythronotus*.
- Utilizar Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para reconocer variaciones en la estructura fina de las partes duras (concha, cinturón y rádula).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de fotografías

Todos los individuos del clado de *I. erythronotus* obtenidos en campo y por el préstamo de las colecciones (véase el capítulo anterior), fueron fotografiados en cuerpo completo en vista dorsal (Fig. 2.3), la vista lateral de la pendiente del área posmucronal (PAP) (Fig. 2.4) y la vista dorsal de las valvas cefálica y anal (Fig. 2.6). Posteriormente, se hizo una selección de fotografías donde se descartaron a los individuos rotos, incompletos y fijados en una posición diferente a la requerida. El total de individuos para cada caso se encuentra en el anexo A.

También fueron elegidos tres ejemplares por localidad para ser desvalvados, y la valva V fue fotografiada solo del lado derecho (considerando como centro el yugo) en vista ventral (Fig. 2.5). En todos los casos anteriores se utilizó el microscopio multifocal Leica DFC 490 del Laboratorio de Fotografía y Microscopía de la Biodiversidad II, del Instituto de Biología (IB) de la UNAM. Adicionalmente, se tomaron fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) de la valva cefálica, de la valva V o VI, de la valva anal, de las escamas del cinturón y de la rádula de un representante de los sistemas arrecifales y de los dos grupos genéticos. Estas fotografías se obtuvieron en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del IB, UNAM. Esto último solo con el objetivo de comparar el trabajo con los que se han llevado a cabo previamente y en los que se incluyen fotografías detalladas, con alta magnificación de la escultura de las valvas de los quitones.

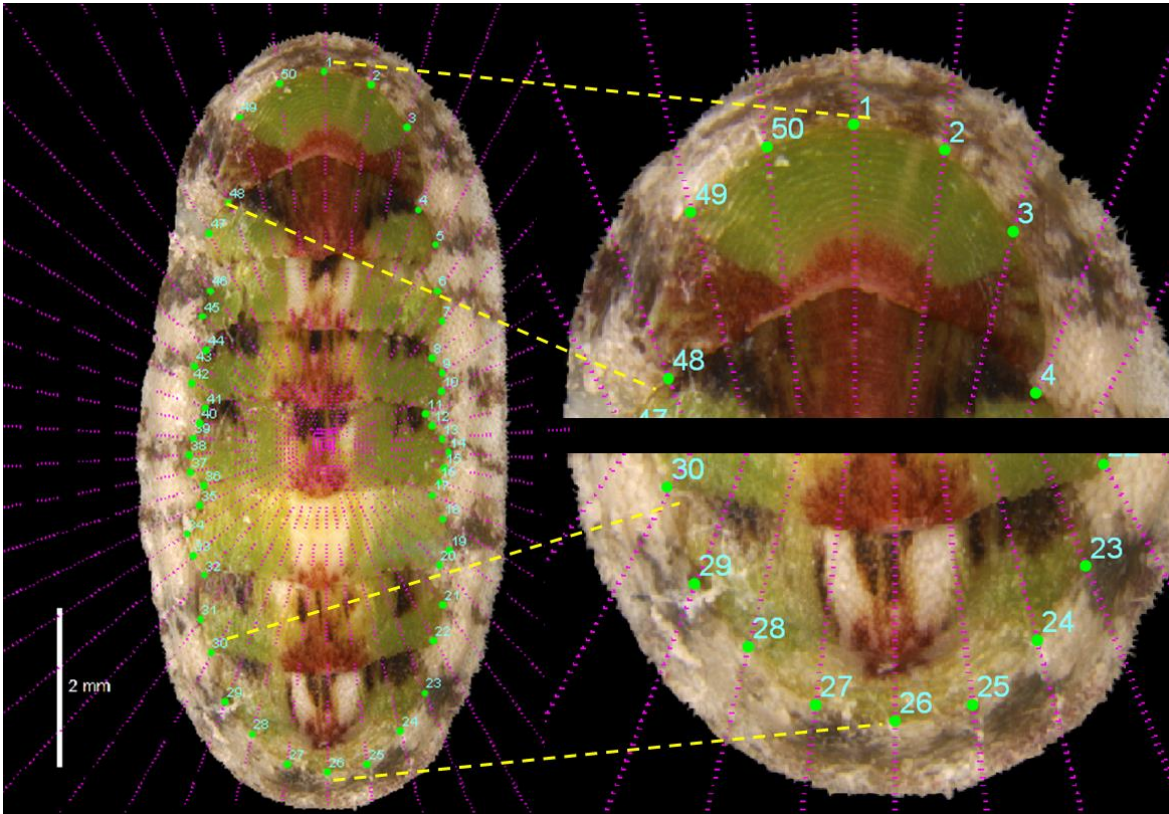


Figura 2.3.- Cuerpo completo de *I. erythronotus*, en vista dorsal, se muestra la disposición de los 50 puntos considerados como *semilandmarks*. El punto #1 marca el punto de mayor curvatura de la valva cefálica y el punto 26 marca el punto de mayor curvatura de la valva anal, ambos puntos fueron considerados como *landmarks* a partir de los cuales se deslizó la curva de todo el cuerpo.

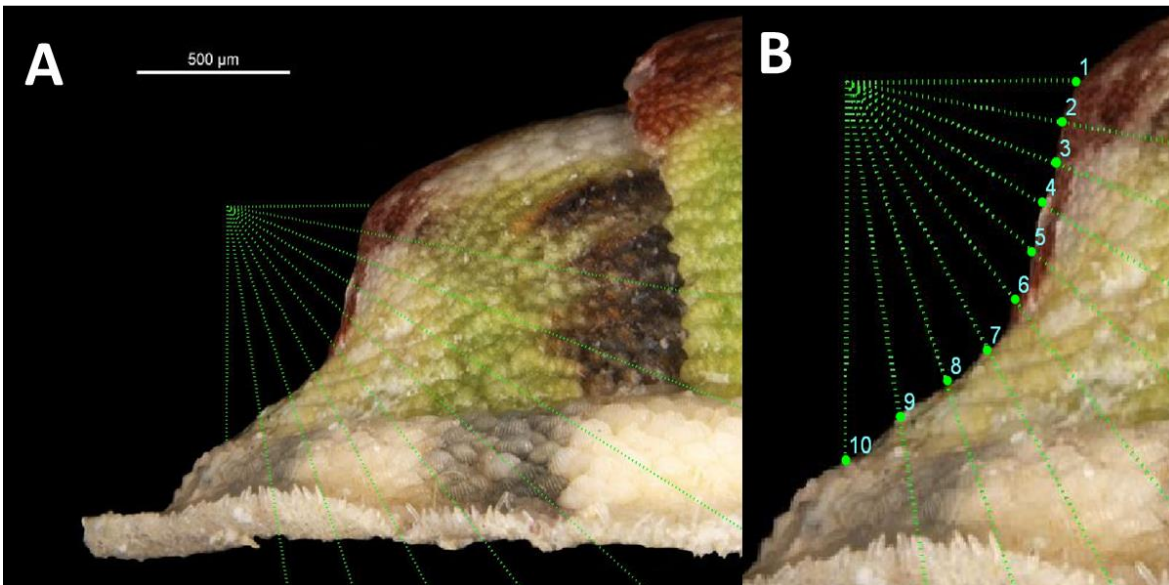


Figura 2.4.- A- Fotografía de la pendiente del área posmucronal de la valva anal en vista lateral, con diez líneas colocadas en MakeFan. B- Disposición de los *landmarks* (1-10) colocados a lo largo de la pendiente del área posmucronal. El punto #1 marca el punto más elevado del mucrón y el punto #10 marca el punto entre la valva anal y el cinturón, ambos puntos fueron considerados como *helper points* para deslizar la curva completa.

Selección de *landmarks* y *semilandmarks*

La forma del cuerpo completo y la forma de la PAP se analizaron utilizando *semilandmarks*. Para colocar los puntos de manera equidistante en ambos casos se utilizó *MakeFan6* (Sheets, 2003) donde se dibujaron líneas correspondientes que sirvieron como guía para colocar los *semilandmarks* (Fig. 2.4). En el caso del cuerpo completo se consideró el punto de mayor curvatura de la valva cefálica como *landmark* 1, y el punto de mayor curvatura de la valva anal como *landmark* 2. En *MakeFan6* se indicaron ambos puntos, posteriormente el programa identificó el punto medio a partir del cual dibujó otras 24 líneas. En total se obtuvieron 50 líneas (*semilandmarks*) alrededor del cuerpo de los quitones (Figura 2.3). Para analizar la forma de la PAP, se consideró como *landmark* 1 el punto más elevado del mucrón, y como *landmark* 2 el punto entre el cinturón y la valva anal. En este caso también se utilizó *MakeFan6* para triangular ambos puntos y posteriormente dibujar 10 líneas (Fig. 2.4A).

Utilizando *tpsUtil* y *tpsDig* (Rohlf, 2015) se digitalizaron los *landmarks* en cada uno de los puntos que coincidían con los *fans* (líneas) colocados previamente (Figura 2.3 y 2.4B). La vista ventral de la valva V fue analizada a partir de seis *landmarks*. Éstos se eligieron dada la posición de las láminas sutúrales (*landmark* 1 y 3), la hendidura de inserción (*landmark* 2) y la posición de las cicatrices musculares (*landmark* 4-6) (Fig. 2.5). En esta última vista también se utilizó *tpsUtil* y *tpsDig* (Rohlf, 2015).

Análisis de datos

Los puntos digitalizados se guardaron como matrices que fueron analizadas en R con las librerías *geomorph* y *Morpho* para obtener el Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés Principal Component Analysis). Se utilizó la librería *shapes* para obtener el Análisis de Varianza Canónica (CVA). También se realizó una regresión lineal y se graficó el cambio en la forma respecto al tamaño del centroide. El tamaño del centroide (CS, por sus siglas en inglés *Centroid Size*) se define como la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas entre todos los *landmarks* y su centroide (media de todos los *landmarks*). Todas las gráficas de los análisis anteriores se construyeron utilizando la librería de R, *ggplot2*.

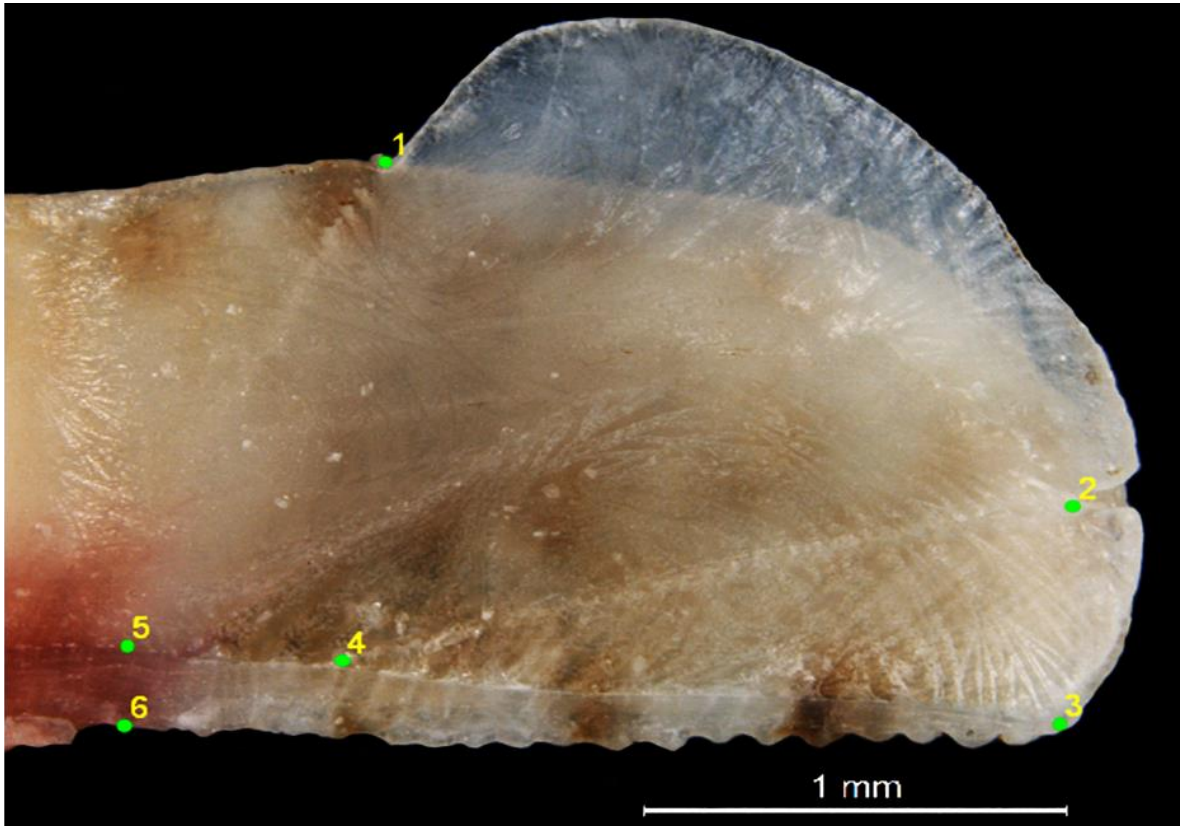


Figura 2.5.- Lado derecho de la valva V en vista ventral. Se muestra la disposición de los *landmarks* (1 a 6) colocados en puntos homólogos del articulamento.

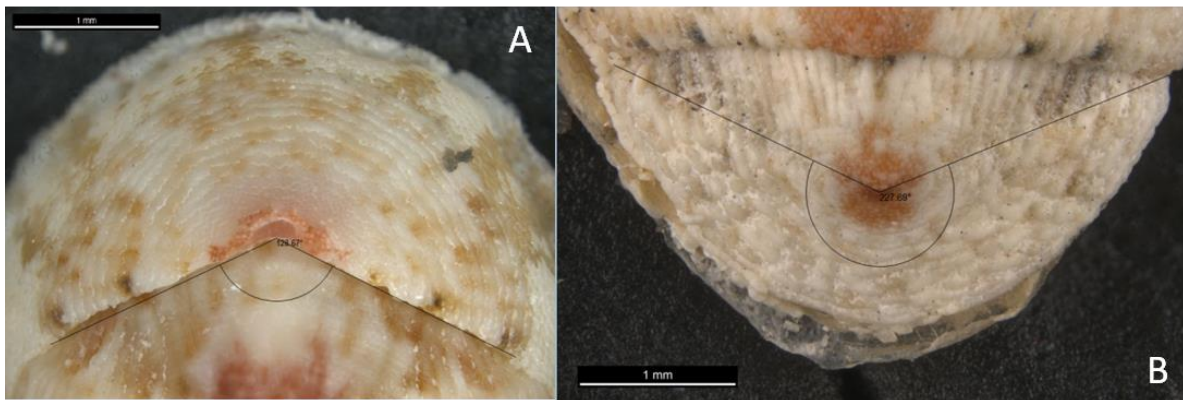


Figura 2.6.- A- Valva cefálica donde se muestran el ángulo dibujado con tpsDig. B- Valva anal donde se muestra el ángulo que se forma desde el mucrón hasta la valva VII.

Posteriormente se llevaron a cabo pruebas de alometría entre sistemas arrecifales y entre clados. Para esto se realizó un Análisis de Covarianza (ANCOVA) para evaluar las diferencias entre los sistemas arrecifales y entre los grupos *Ischnochiton* sp. e *I. erythronotus*, debido a la interacción que existe entre la forma (de cada una de las estructuras evaluadas con *landmarks* o *semilandmarks*) y el tamaño (logaritmo del tamaño del centroide). Para esto también se utilizó la librería de R,

geomorph. En el ANCOVA se utilizaron los *relative warps*. Se consideró la forma como variable, el tamaño del centroide como covariable y las especies/arrecifes como factor de agrupación; además, previo a este análisis, se llevó a cabo una prueba de homogeneidad de pendientes.

También se graficó la varianza acumulada en los tres primeros componentes de los PCA, para cada una de las vistas, extrayendo los *relative warps* obtenidos en R. En este gráfico se incluyó el cambio en la forma para cada vista en los valores extremos dentro de los tres primeros componentes del Análisis de Componentes Principales, tales cambios en la forma se obtuvieron utilizando tpsReg v1.45 (Rohlf, 2015).

Las fotografías en vista dorsal de las valvas cefálica y anal fueron procesadas en tpsUtil v1.76 y tpsDig2 v2.31 para colocar ángulos que fueron guardados como objetos. En el caso de la valva cefálica se consideraron los puntos entre esta valva, la valva II y el cinturón (Figura 2.6A). Para la valva anal se consideraron los puntos entre esta valva, la valva VII y el cinturón, abriendo el ángulo desde el punto en que se encuentra el mucrón (Figura 2.6B). Los valores de los ángulos se analizaron en R, realizando una ANOVA, gráficas de caja y bigote, por último, se realizó un análisis *post hoc* aplicando una prueba pareada de Tukey.

RESULTADOS

Variación de la forma

El PCA de la forma del cuerpo completo agrupa a los quitones de los ABC con los del SAM y estos se diferencian de los del SAV, tales diferencias se encuentran en el primer componente, donde se encuentra más del 60% de la variación total (Fig. 2.7). En el caso de la PAP, la gráfica de la forma en los dos primeros componentes no separa gráficamente a ninguno de los sistemas arrecifales, a pesar de que con los dos primeros componentes se acumula más del 80% de la variación de la forma (Fig. 2.8). La gráfica del cambio de la forma de la valva V muestra que los individuos del SAV y el SAM también se separan de los individuos del SAV, más de 63% según los dos primeros componente principales (Fig. 2.9).

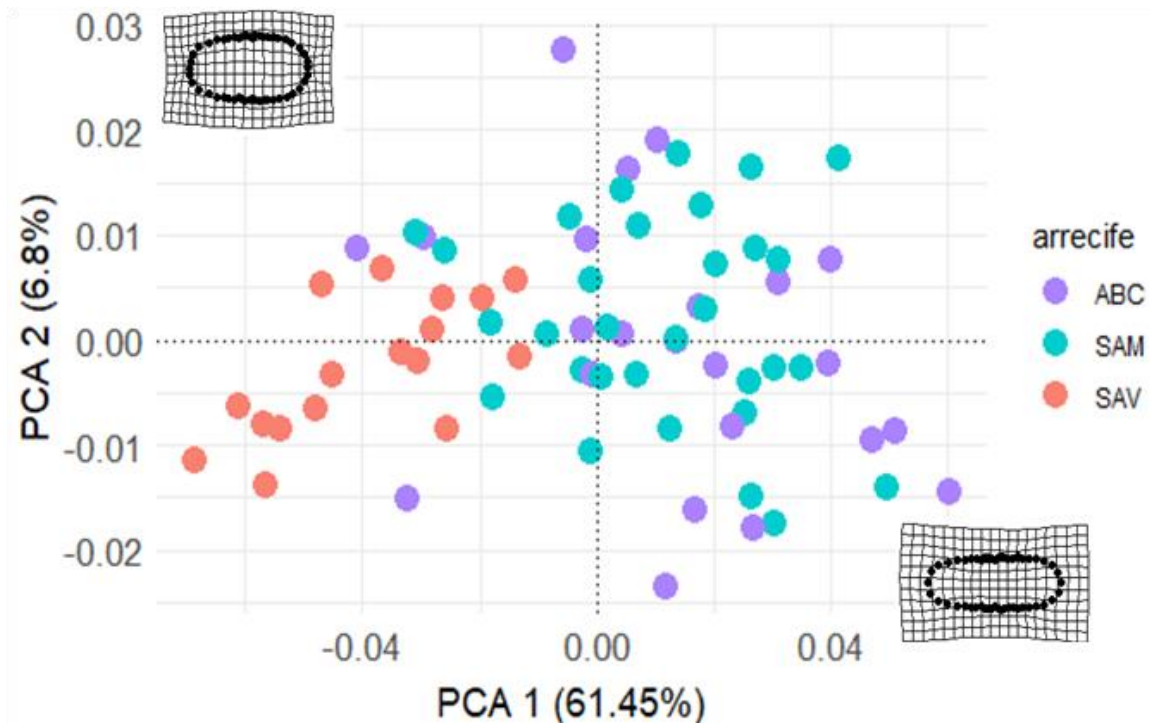


Figura 2.7. PCA de los dos primeros componentes de la forma del cuerpo completo del clado de *I. erythronotus*. Cada color corresponde a uno de los distintos sistemas arrecifales. Las mallas de deformación muestran el cambio en la forma del cuerpo de los individuos que se encuentran en los extremos de los puntos graficados en ambos componentes.

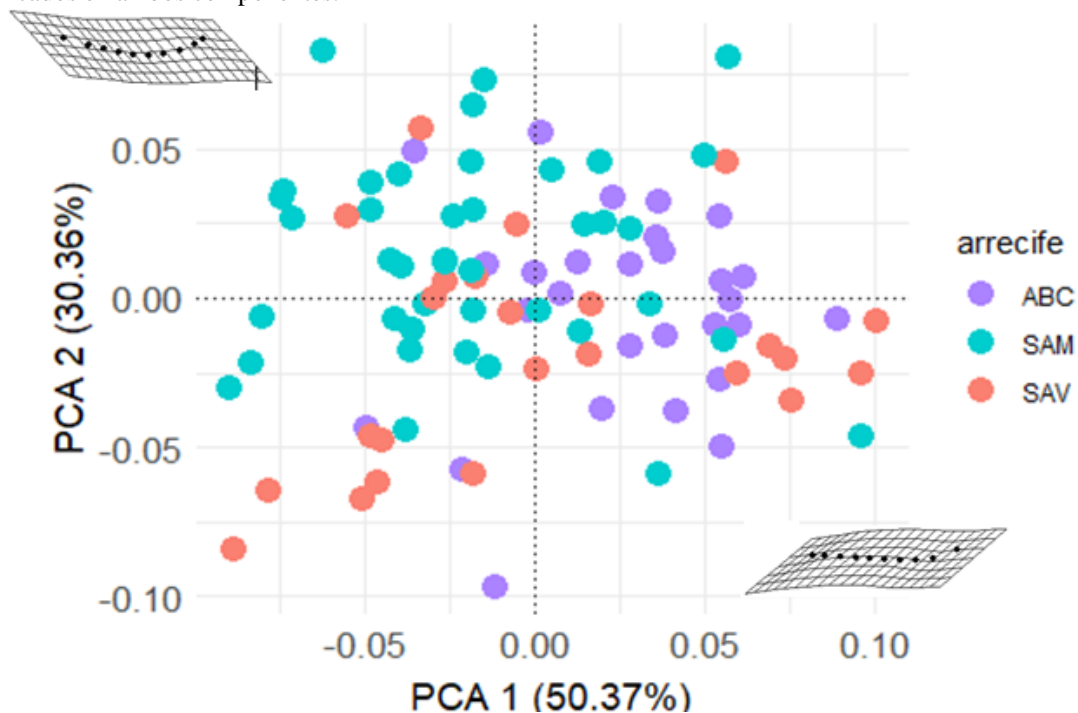


Figura 2.8. PCA de los dos primeros componentes de la forma de la PAP del clado *I. erythronotus*. Cada color corresponde a uno de los distintos sistemas arrecifales. Las mallas de deformación muestran cómo cambia la forma de la PAP de los individuos que se encuentran en los extremos de los puntos graficados en ambos componentes.

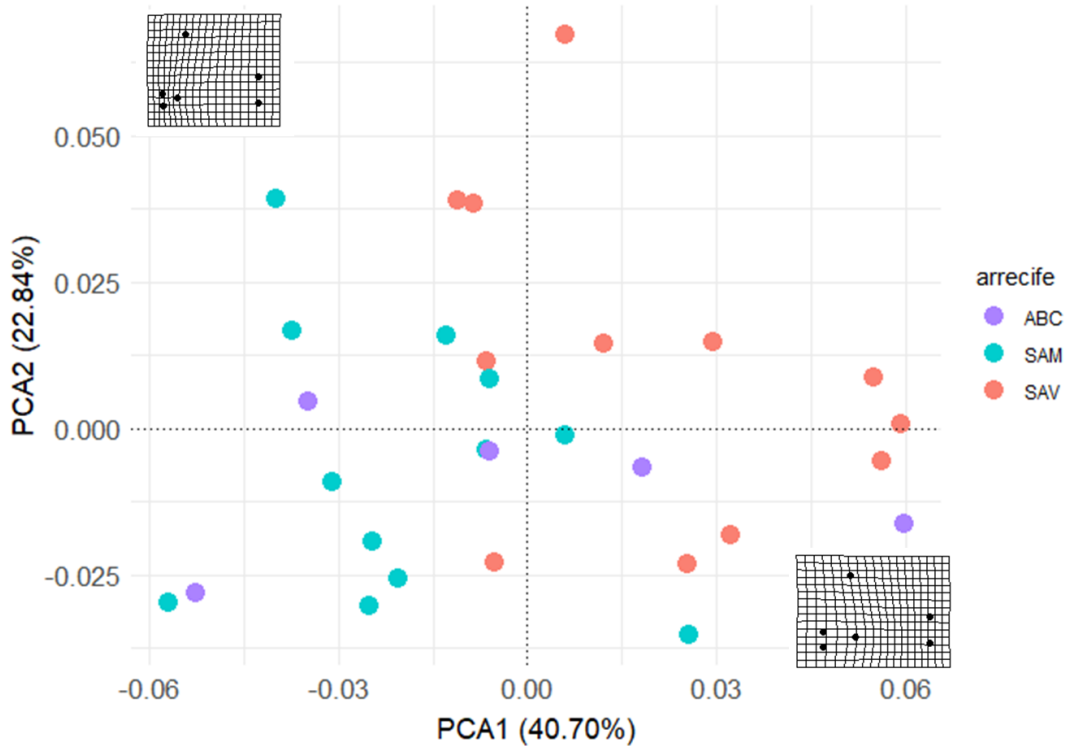


Figura 2.9. PCA de los dos primeros componentes de la forma de la valva V del clado de *I. erythronotus*. Cada color corresponde a uno de los distintos sistemas arrecifales. Las mallas de deformación muestran cómo cambia la forma de la valva V de los individuos que se encuentran en los extremos de los puntos graficados en ambos componentes.

Variación de la forma en cada vista

La mayor parte de la varianza de la forma se acumula casi en su totalidad en los tres primeros componentes (*relative warps*). El cuerpo completo es la vista de los quitones que muestra la mayor parte de la varianza acumulada, 60% tan solo en el primer componente, y sólo aumenta a 70% considerando el segundo componente (Fig. 2.16). Aunque falta 30% de la variación, ésta se encuentra repartida en casi 50 componentes más (en esta vista se utilizaron 50 *semilandmarks*).

La variación de la forma del mucrón se acumula en un 50% en el primer componente, 80% y 90% considerando el componente dos y tres, respectivamente, es decir, con los tres primeros componentes casi se acumula la varianza total de la forma (Fig. 2.16). Mientras que la varianza de la forma de la valva V, se acumula en 40, 60 y 70% con los tres primeros componentes respectivamente, es decir la varianza en esta vista se reparte entre más componentes. Además, se incluyeron gráficamente los ejes de deformación de cada componente (Fig. 2.16). Se observa que en el primer componente se acumula mayor parte de la deformación de la forma para todas las vistas.

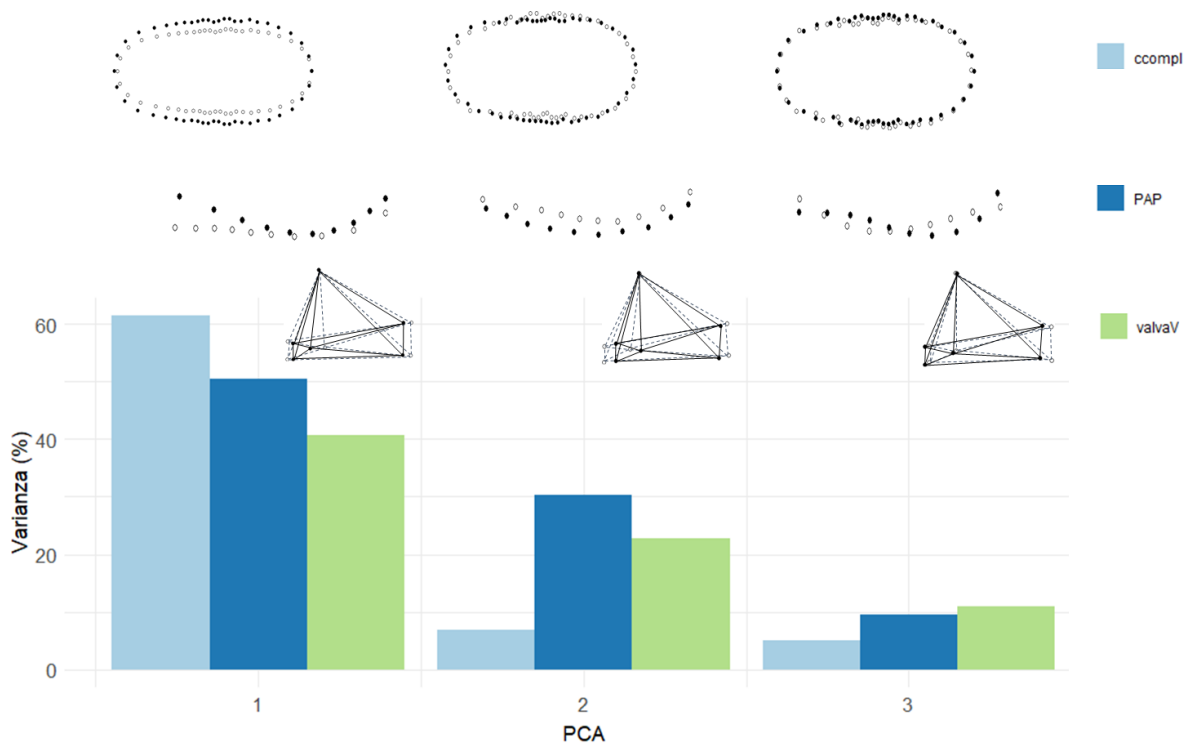


Figura 2.16. Porcentaje de la varianza acumulada en los tres primeros componentes principales para cada una de las vistas (representadas con los colores). Arriba se muestra cómo cambia la forma del cuerpo completo, la PAP y la valva V, respectivamente en orden ascendente. La representación en las imágenes incluye la forma de los valores extremos para cada componente, puntos vacíos representan la forma con valores positivos y los puntos oscuros representan la forma de los valores negativos en el Análisis de Componentes Principales (PCA)

Relación entre tamaño y forma

La regresión de la forma del cuerpo completo respecto al tamaño del centroide (en todos los casos se utilizó el logaritmo natural del tamaño del centroide) mostró un valor de $R^2= 0.34$, $p= 6.667e-08$, es decir, existe una relación significativa en el cambio de la forma (acumulada en el componente uno, PCA1) respecto al tamaño del centroide (Fig. 2.10). El cambio en la forma acumulada en primer componente de la PAP respecto el tamaño del centroide no fue significativo, ya que se obtuvieron $R^2=0.01$, $p= 0.33$, gráficamente tampoco se observan diferencias de tal relación según el arrecife al que pertenecen los individuos (Fig. 2.11). Esta misma relación de la forma respecto al tamaño del centroide de la valva V tampoco fue significativa en el primer componente, los valores fueron $R^2= 0.00019$, $p= 0.005$, gráficamente se separan los individuos de los ABC y el SAM del SAV (Fig. 2.12).

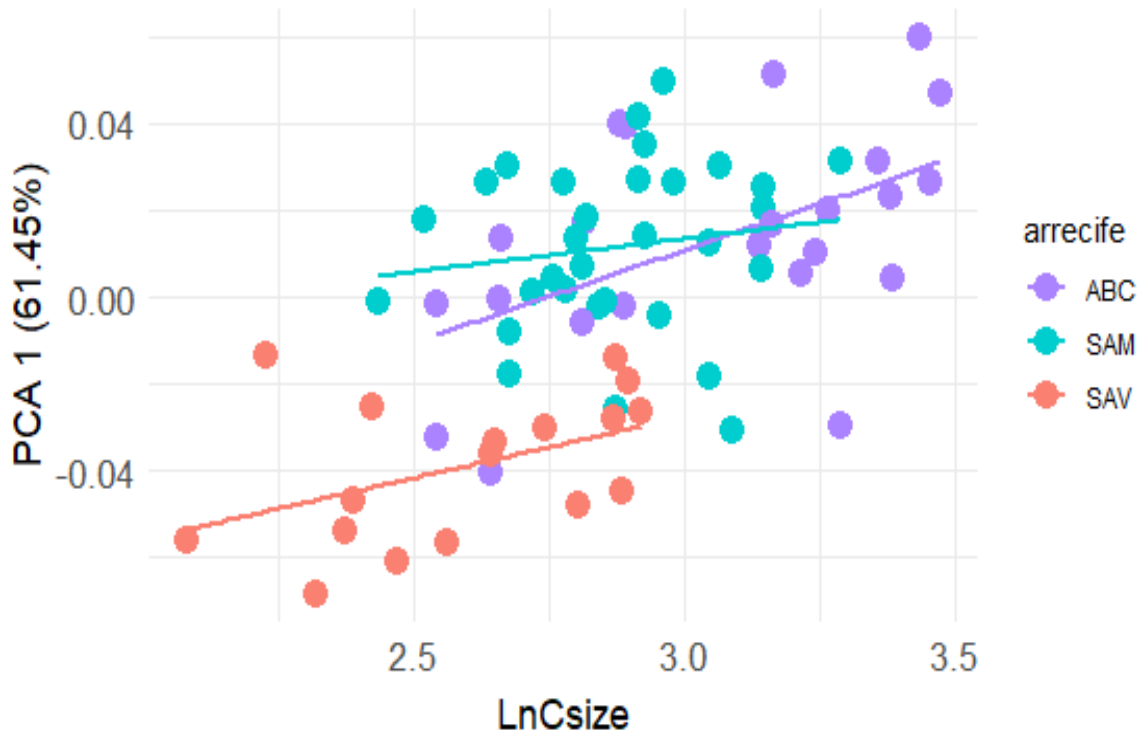


Figura 2.10. Regresión del logaritmo natural del tamaño del centroide (LnCsize) de la forma del cuerpo completo del clado de *I. erythronotus* versus la forma acumulada en el primer componente. Los colores diferencian a los individuos de los distintos sistemas arrecifales.

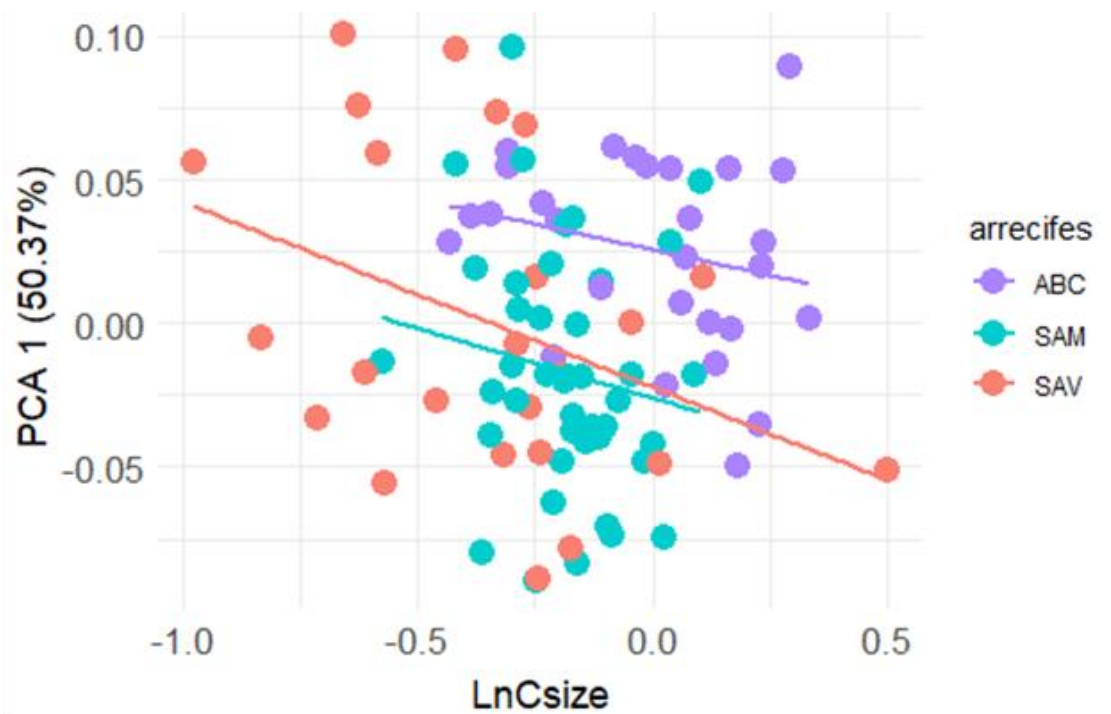


Figura 2.11. Regresión del logaritmo natural del tamaño del centroide (LnCsize) de la forma de la PAP del clado *I. erythronotus* versus la forma acumulada en el primer componente. Los colores diferencian a los individuos de los distintos sistemas arrecifales.

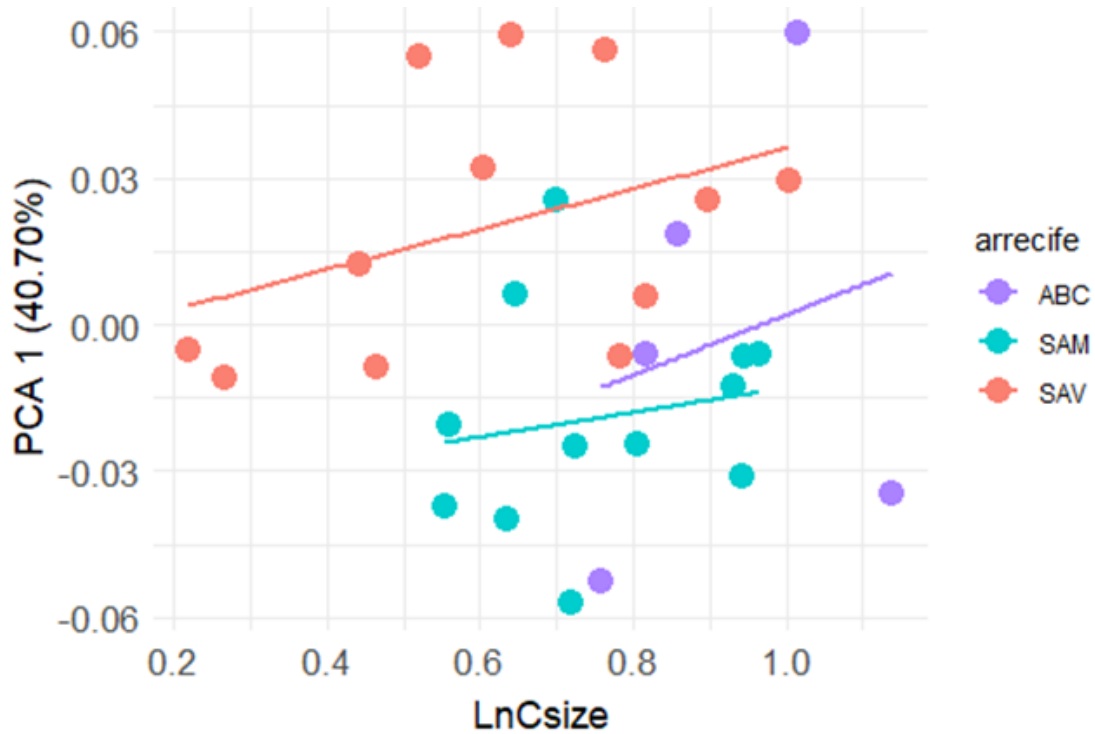


Figura 2.12. Regresión del logaritmo natural del tamaño del centroide (LnCsize) de la forma de la valva V del clado de *I. erythronotus* versus la forma acumulada en el primer componente. Los colores diferencian a los individuos de los distintos sistemas arrecifales.

Variación de la forma entre sistemas arrecifales

Los Análisis de Varianza Canónica gráficamente agrupan a los individuos según el arrecife al que pertenecen, utilizando la forma del cuerpo completo (Fig. 2.13). Sin embargo, esto no pasa con la forma de la PAP (Fig. 2.14). En el caso del cuerpo completo el CVA 1 acumula casi 100% de la variación, pero no se forman grupos gráficamente, mientras que el mismo análisis de la PAP acumula sólo cerca de 56% de la variación, además con esta vista los individuos de los distintos arrecifes se sobrelapan. Mientras tanto la gráfica de este análisis para la valva V separa en dos grupos a los individuos a lo largo del CVA1, donde se encuentra acumulada 72% de la variación con los dos primeros CVA (Fig. 2.15).

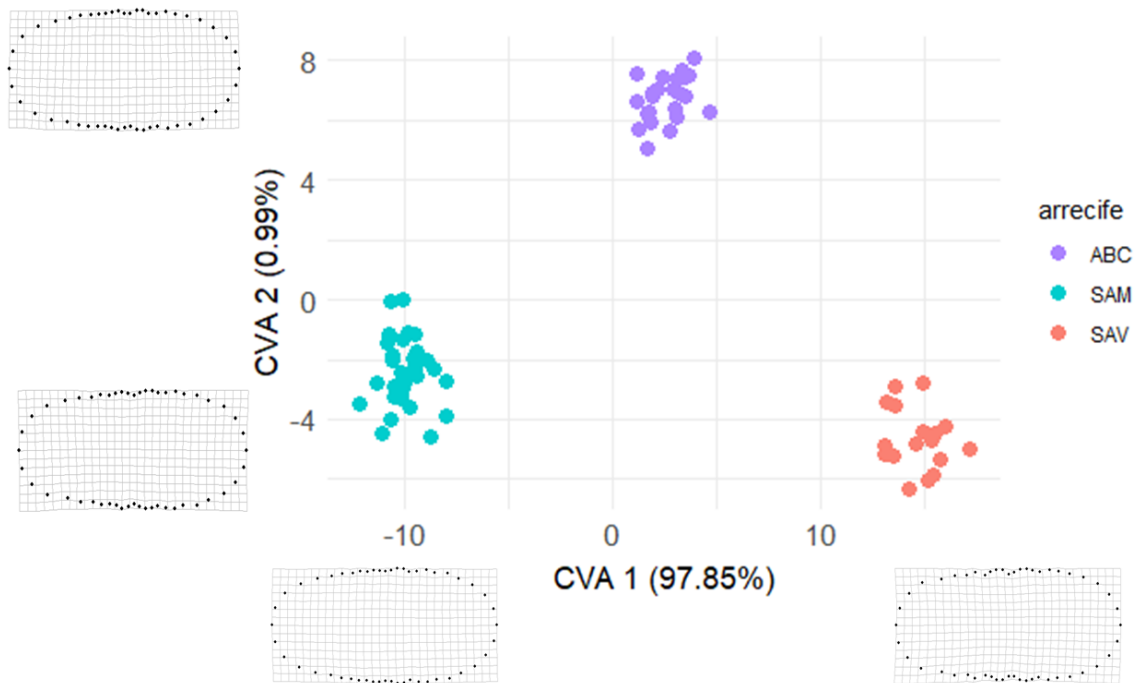


Figura 2.13. Gráfica del Análisis de Varianza Canónico (CVA) de la forma del cuerpo completo del clado de *I. erythronotus*. Los colores representan el sistema arrecifal al que pertenece cada uno de los individuos. Las mallas de deformación representan el cambio de la forma del cuerpo de los individuos que se encuentran graficados en los extremos de los dos primeros vectores.

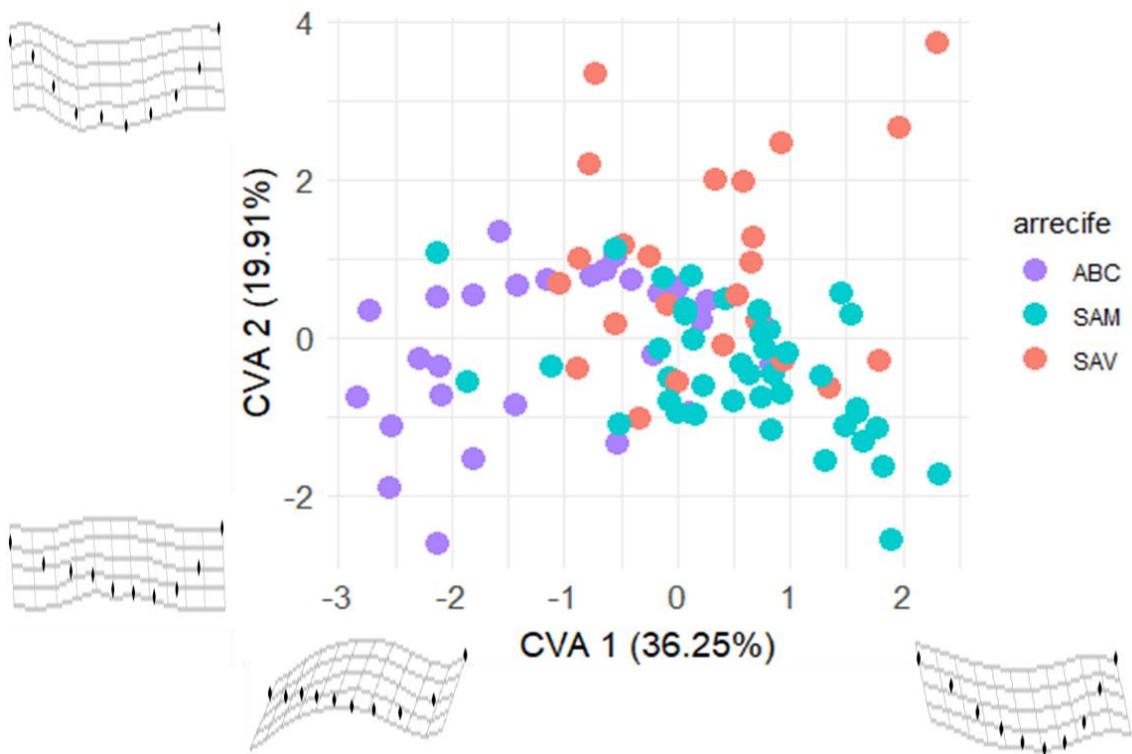


Figura 2.14. Gráfica del Análisis de Varianza Canónico (CVA) de la forma de la Pendiente del Área Posmucronal (PAP) del clado de *I. erythronotus*. Los colores representan el sistemas arrecifal al que pertenece cada uno de los quitones. Las mallas de deformación representan el cambio de la forma de la PAP de los individuos que se encuentran graficados en los extremos.

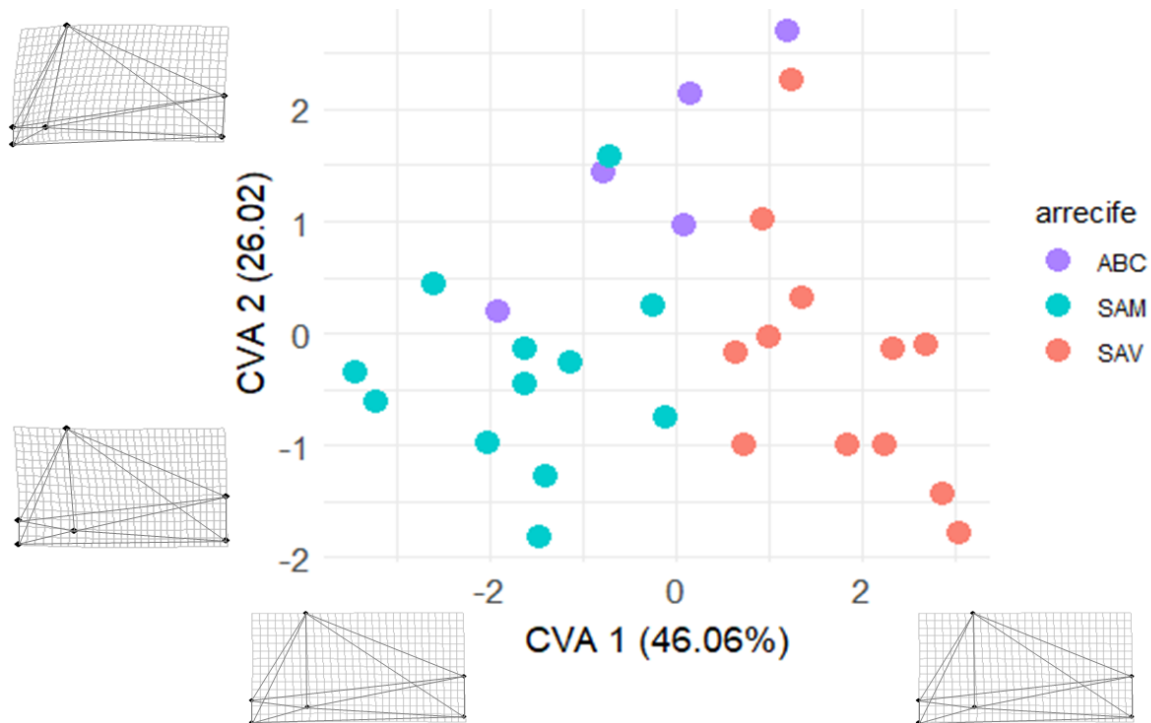


Figura 2.15. Gráfica del Análisis de Varianza Canónico (CVA) de la forma de la valva V del clado de *I. erythronotus*. Los colores representan el sistema arrecifal al que pertenece cada uno de los individuos. Las mallas de deformación representan el cambio de la forma de la valva V de los individuos que se encuentran graficados en los extremos.

Prueba de alometría

Tabla 2.1. Valores de ANCOVA para la prueba de alometría. Se muestran valores de las tres vistas analizadas, comparando entre sistemas arrecifales y entre los grupos propuestos como especies, los valores de *p* remarcados con gris corresponden a los valores significativos $p < 0.05$.

	Entre arrecifes			Entre especies		
	F	Z	p	F	Z	p
Cuerpo completo	1.39	2.22	0.02	1.74	2.25	0.02
PAP	2.39	2.15	0.008	4.75	2.28	0.004
Valva V	0.35	0.35	0.91	0.60	0.6	0.58

La alometría se evaluó mediante un ANCOVA. En este análisis se midió el cambio en la forma debido a la interacción del tamaño del centroide entre sistemas arrecifales y entre las dos especies (propuestas en el capítulo 1). Dicho análisis mostró resultados significativos en ambos casos para la forma del cuerpo completo y la PAP (Tabla 2.1). Previo a llevar a cabo esta prueba, se realizó una prueba de homogeneidad de pendientes (Anexo 7) donde los resultados para la valva V no fueron significativos, por lo que estrictamente el ANCOVA no podía llevarse a cabo.

Análisis de la forma entre grupos genéticos

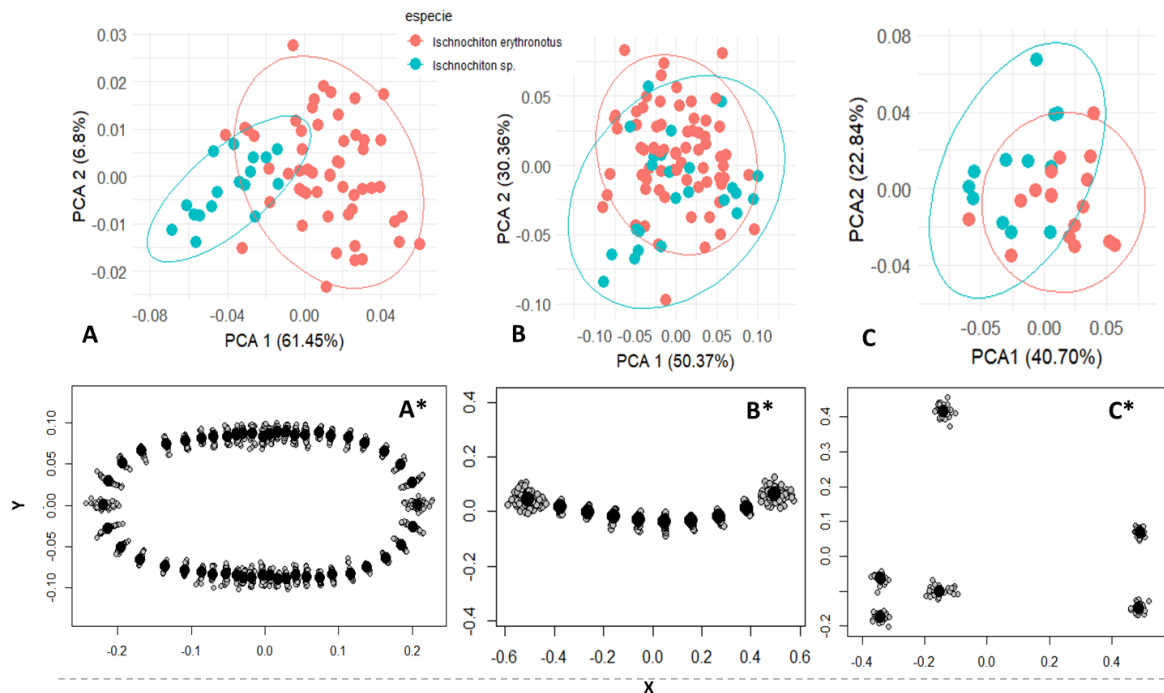


Figura 2.17. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los grupos filogenéticos del clado de *I. erythronotus* propuestos como: *I. erythronotus* e *Ischnochiton* sp. Las elipses representan 95% de confianza. A- PCA para ambos grupos con la forma del cuerpo completo. A*- Superposición de Procrustes para los *semilandmarks* del cuerpo completo. B- PCA de ambos grupos con la forma de la PAP. B* Superposición de Procrustes para los *semilandmarks* de la PAP. C- PCA de ambos grupos con la forma de la valva V. C*- Superposición de Procrustes para los *landmarks* de la valva V.

La comparación de los dos primeros Componentes Principales considerando a *Ischnochiton* sp., como un grupo diferente muestra diferencias para cada una de las vistas. En el caso del cuerpo completo en vista dorsal se observa que es un carácter que separa como un grupo distinto a *Ischnochiton* sp. (Fig. 2.17 A). Lo anterior no se observa en el caso de la PAP, pues la dispersión de los puntos para ambos grupos en la misma (Fig. 2.17 B). En el caso de la valva V se observa una vez más la formación de dos grupos donde los individuos de *Ischnochiton* sp. se separan de *I. erythronotus* (Fig. 2.17 C).

Análisis del ángulo de las valvas

Tanto la valva cefálica como la valva anal presentan ángulos que varían entre los individuos de los diferentes sistemas arrecifales (Fig. 2.18). El ángulo de la valva anal presenta valores medios más similares entre los ABC y el SAM que con el SAV. No pasa lo mismo con los valores de la valva anal, ya que la media de los valores de los ángulos en esta estructura es más cercana entre los ABC y el SAV que con el SAM. Además, el ANOVA de la comparación de estos valores para cada uno de los sistemas arrecifales presenta valores significativos (Tabla 2.2). No obstante, solo con los

valores de la prueba post hoc que se llevó a cabo utilizando la prueba de Tukey, es posible reconocer que las poblaciones con individuos que presentan diferencias en los ángulos de estas valvas. La prueba de Tukey indica que los individuos del SAV presentan una valva cefálica con ángulo significativamente diferentes de los que presentan los individuos del SAM y los ABC, (Fig. 2.19 A). Mientras que en el caso de la valva anal los ángulos con diferencias significativas se encuentran entre los individuos de los ABC y el SAM (Fig. 2.19 B). En el anexo 8 se encuentra el resto de las comparaciones.

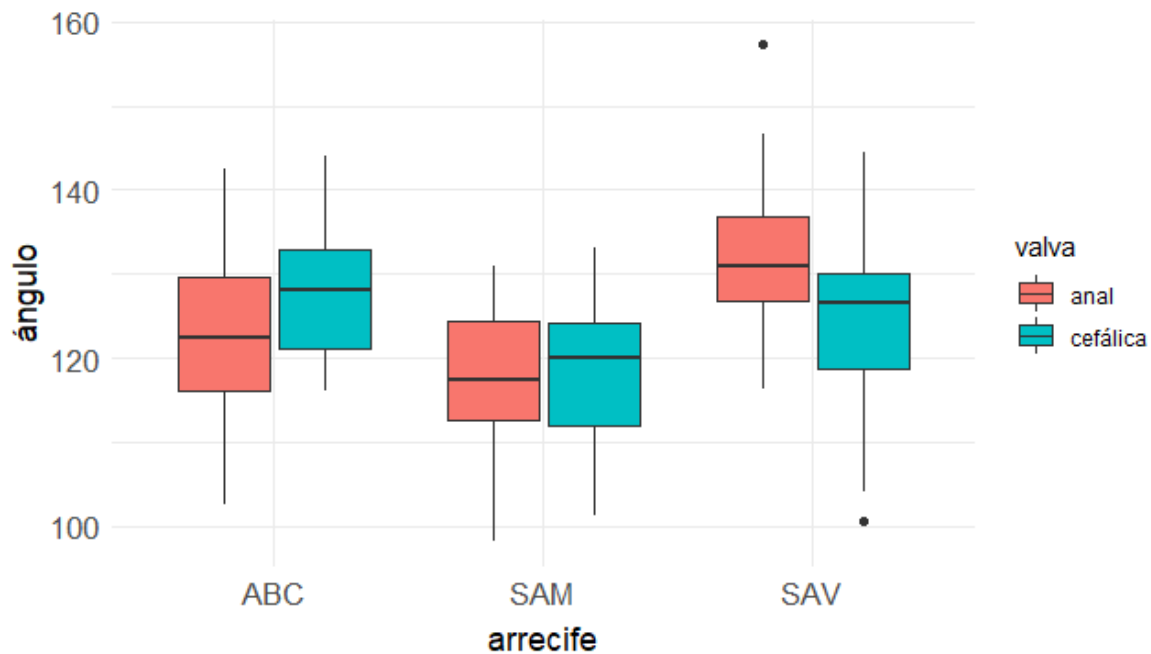


Figura 2.18. Comparación de los ángulos de la valva cefálica y la valva anal de los individuos de cada uno de los sistemas arrecifales.

Tabla 2.2. Valores de F y P obtenidos con ANOVA con los ángulos de las valvas cefálica y anal, entre poblaciones y sistemas arrecifales.

	Valva cefálica		Valva anal	
	Población	Arrecife	Población	Arrecife
ANOVA	3.53	10.06	8.24	22.68
P	0.0006021 ***	0.00011 ***	3.425e-09 ***	9.468e-09 ***

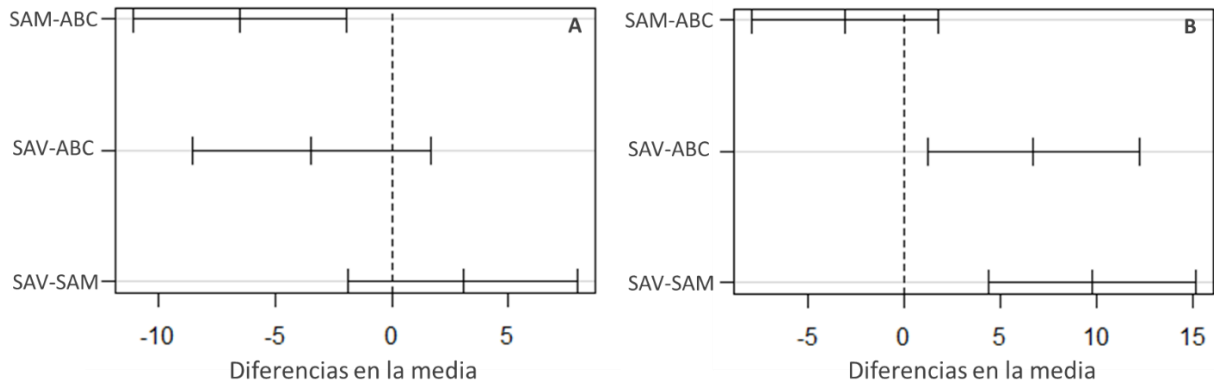


Figura 2.19. Prueba de Tukey entre arrecifes, se muestra la media de los valores de: A-valva cefálica B-valva anal, con 95% de confianza. Las barras de las comparaciones que cruzan por la línea punteada representan comparaciones significativamente diferentes.

Estructuras duras de los quitones, entre sistemas arrecifales.

Para esta comparación se presenta la descripción de *I. erythronotus* según Kaas y Van Belle (1987) y García- Ríos (2003), seguida “observaciones” realizadas con los individuos examinados en este trabajo, observados con Microscopía Electrónica de Barrida. Nota: si es necesario, volver a las Figuras 2.1-2 para recordar las partes de las valvas. La comparación de las estructuras de los individuos dentro de los sistemas arrecifales, se encuentran en el Apéndice 1.

Valva cefálica (I)

Descripción. Canales concéntricos irregulares separados por cordones, estos cordones se encuentran ligeramente levantados e interrumpidos por ralladuras radiales que algunas veces se encuentran débiles o ausentes

Observación

En los individuos de los ABC y el SAM definidos como *I. erythronotus* se observa que la valva cefálica (Fig. 3.1, Ib-c) en el tegumento presentan los cordones concéntricos (marcados con puntos) reciben este adjetivo (“concéntrico”) porque siguen la circunferencia de la parte posterior de la valva cefálica. Estos cordones no aparecen continuos y son interrumpidos por las ralladuras radiales (señaladas por flechas), llamados así porque su orientación es paralela al radio de la valva. Entre los cordones se forman canales, también concéntricos, bien definidos y encerrados en la imagen por recuadros. No pasa lo mismo con el quitón del SAV considerado como *Ischnochiton* sp. ya que en la valva cefálica (Fig. 3.1, Ia) se observan cordones muy tenues que se extienden en zigzag siguiendo la circunferencia de la valva, debido a esto, los canales entre los cordones son irregulares

y poco perceptibles. En todos los casos se observa que los patrones en la escultura se desvanecen hacia el centro de la valva.

Valvas intermedias (II-VII)

Descripción. Área central presenta cordones longitudinales muy fuertes y elevadas cerca del cinturón; se desvanecen cerca del área del yugo. Estos cordones se extienden a las áreas laterales donde se tornan algo irregulares en su dirección y suelen estar entrecortadas irregularmente por algunos surcos radiales. Los cordones suelen dar una apariencia dentada en el borde posterior de la valva.

Observación Valva V.

El quitón del SAV no presenta tegumento con cordones longitudinales como en la descripción de *I. erythronotus* (Fig. 3.1, Va). En su lugar se observan cordones tenues que se extienden tanto en la zona intermedia como en las zonas laterales, aparecen en zigzag de manera irregular extendiéndose por toda la valva de manera uniforme ya que las zonas intermedias no están levantadas. También los canales (encerrados en recuadros) se observan irregulares, y muy débiles, adoptando la forma en zigzag de los cordones.

La valva del quitón de los ABC (Fig. 3.1, Vb) presenta una escultura tenue, posiblemente debido a la erosión. El patrón es de cordones longitudinales en las zonas laterales, cumpliendo con la descripción de *I. erythronotus* que además es igual a la observada en el quitón del SAM (Fig. 3.1, Vc). En ambos individuos se observan cordones longitudinales (marcadas con líneas verticales) en las zonas intermedias, dichos cordones se desvanecen hacia el centro de la valva hasta desaparecer y presentar una escultura lisa en la parte del yugo (zona en la que se observan los asteriscos). Los cordones son “algo curvos” en las zonas laterales, éstas están ligeramente levantadas y se entrecortan por surcos radiales que aparecen de manera irregular. Se encierra parte de ellos con recuadros y se observan mejor en la valva de los ABC (Fig. 3.1 Vb).

Valva anal (VIII)

Descripción. Área posmucronal con canales concéntricos irregulares igual a los que se encuentran en la valva cefálica, el área premucronal presenta cordones longitudinales muy fuertes que se desvanecen cerca del área del yugo.

Observación

La valva anal del SAV en el área posmucronal presenta un tegumento con escultura tenue (Fig 3.1 VIIIa). Ahí se observan cordones concéntricos que se disponen en forma de zigzag, en el área premucronal se pierde esta disposición y se observa una escultura más lisa que se difumina más en

el centro de la valva y casi desaparece cerca del mucrón. (Recordemos que el yugo es la parte central de las valvas II-VIII, pero en la valva anal (VIII) recibe el nombre de mucrón).

El tegumento en las valvas de los quitones de los ABC y el SAM, en el área posmucronal presenta cordones concéntricos (marcados con la línea de puntos); están levantados e interrumpidos por ralladuras irregulares y se separan por canales concéntricos igual que en la valva cefálica. En el área premucronal se observan cordones longitudinales (igual que en las zonas intermedias de la valva V) que se desvanecen hacia el centro de la valva y cerca del mucrón (Fig 3.1 VIIIb-c). En esta valva el quitón de los ABC también luce erosionado ya que presenta escultura más lisa que el quitón del SAM, pero con los mismos patrones en la escultura.

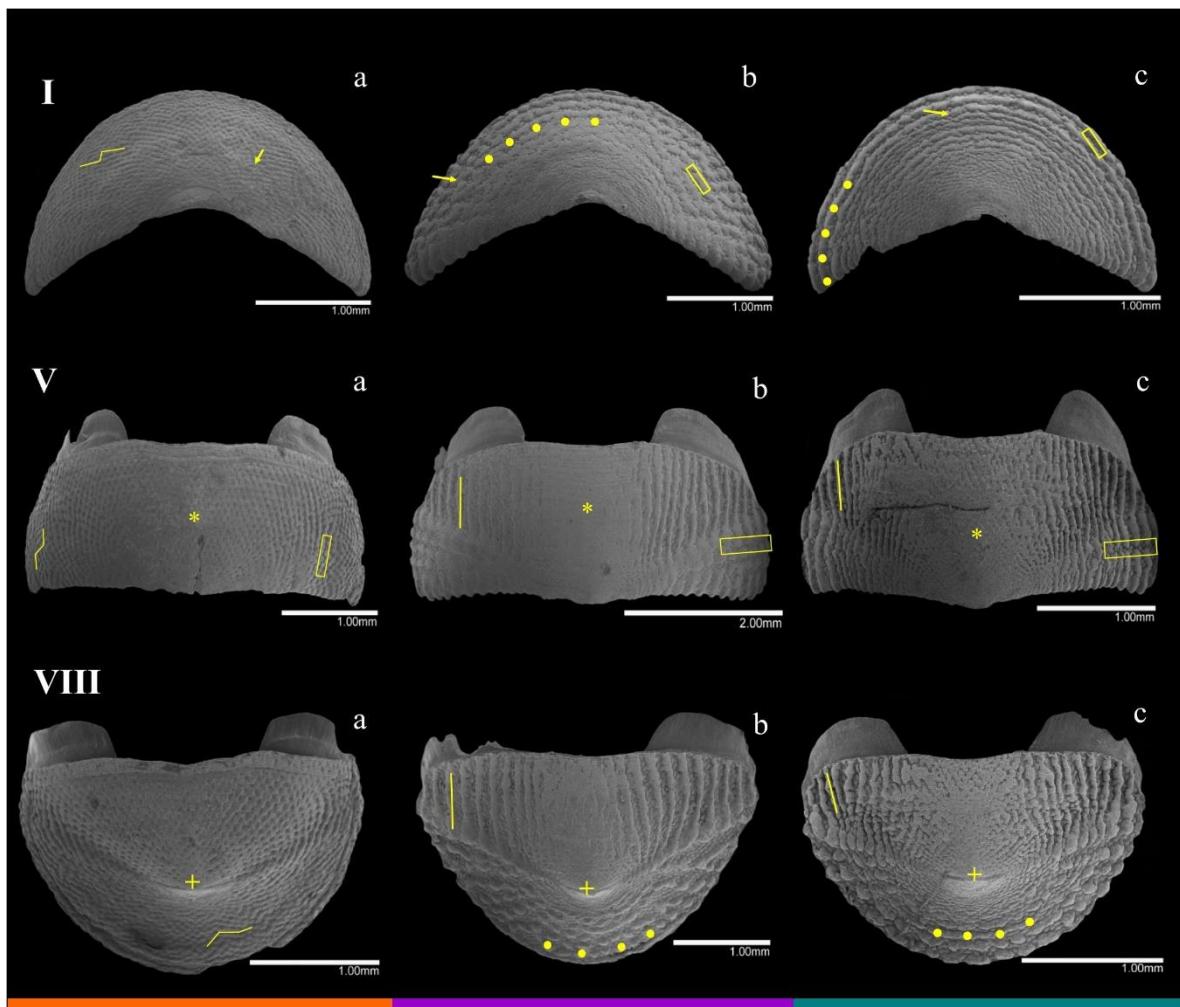


Figura 3.1. Acercamiento de la escultura del tegumento de las valvas: I- cefálica, V- intermedia (V) y VIII- anal. Se incluye un individuo de cada uno de los sistemas arrecifales: a- Mocambo (Mo) del Sistema Arrecifal Veracruzano; b- Arenas (An) de los arrecifes del banco de Campeche; c- Akumal (Ak) del Sistemas Arrecifal Mesoamericano. La línea de puntos marca los cordones concéntricos; las líneas en zigzag, los cordones en zigzag; los rectángulos, los canales concéntricos; las fechas, las ralladuras radiales; las líneas rectas, los cordones longitudinales; los asteriscos, la zona central; y las cruces, el mucrón.

Acercamiento a la escultura del tegumento

Descripción (Reyes-Gómez et al., 2017). Se encuentran megalostetos rodeados por 7-8 microestetos.

Observación

El individuo del SAV muestra un patrón en el tegumento uniforme y tenue, dando una apariencia de ondulaciones con gránulos finos (Fig. 3.2, 1a). La fotografía de la escultura fina deja ver que los estetos son todos del mismo tamaño (Fig. 3.2, 1b-c). Mientras tanto, los individuos de los ABC y el SAM presentan una escultura con grandes elevaciones irregulares en las áreas laterales, entre las que se encuentran los canales concéntricos (3.2, 2a-3a). En la escultura fina de estos dos individuos se observan megalostetos (señalados con flechas) los cuales están rodeados por entre 6 y 8 microestetos (Fig. 3.2, 2b-c, 3b-c).

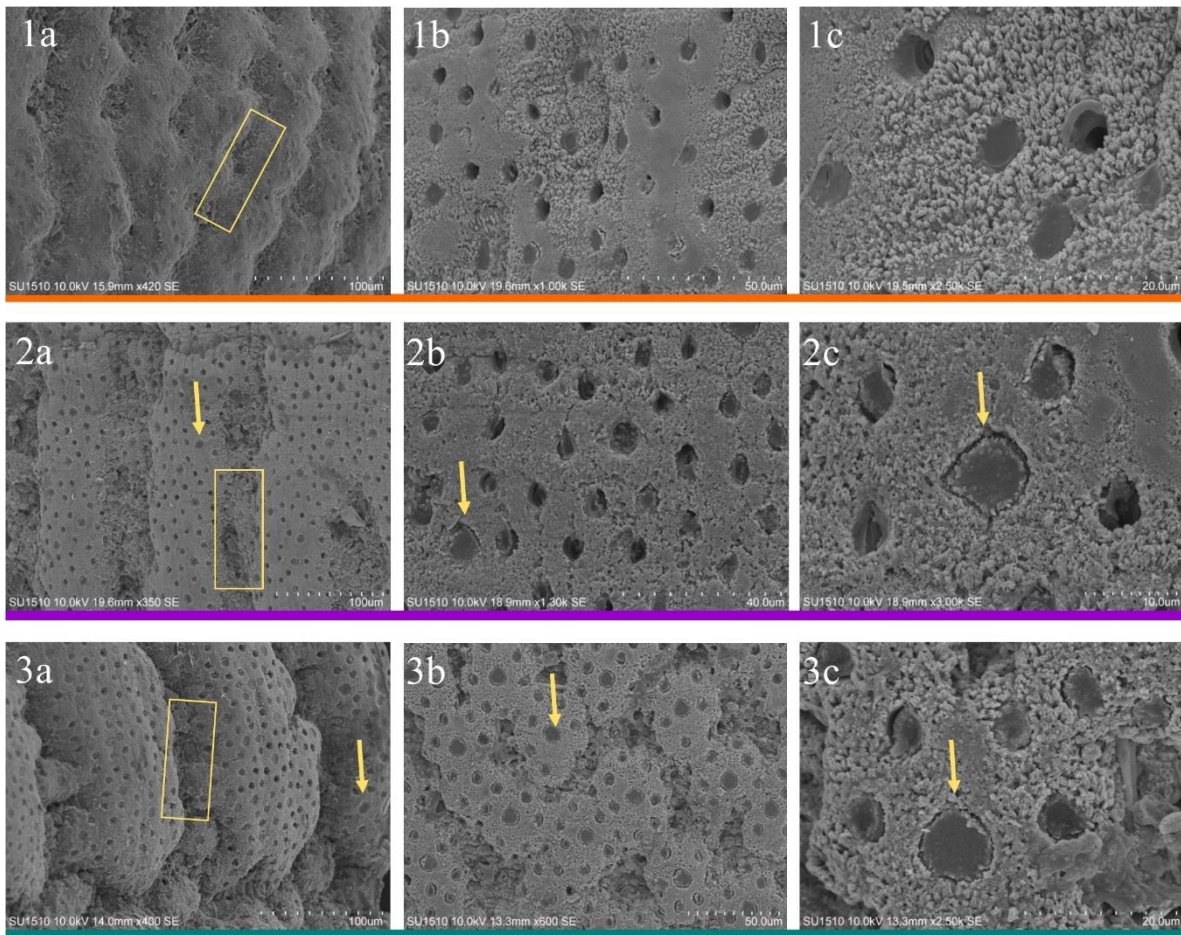


Figura 3.2. Distintos acercamientos de la escultura del tegumento de la valva intermedia: a- zona lateral, b- zona intermedia. Las líneas de colores diferencian el sistema arrecifal: naranja-Sistema Arrecifal Veracruzano; morado- arrecifes del banco de Campeche; verde- Sistema Arrecifal Mesoamericano. Se muestran los individuos de: Mocambo (Mo), Arenas (An) y Akumal (Ak), respectivamente, se trata de los mismos individuos de la figura 3.1. Los rectángulos encierran parte de los canales concéntricos y las flechas señalan los megalostetos.

Escamas en el cinturón

Descripción. El cinturón está cubierto con escamas sobrepuestas, ovaladas que presentan entre 9-12 estrías separadas por costillas.

Observación

En las fotografías del cinturón de los individuos de los tres sistemas arrecifales, se encuentran dibujadas barras amarillas que marcan cinco de las estrías presentes en las escamas, las flechas señalan solo una escama en cada caso. En la foto del SAV esta barra abarca menos de un cuarto del ancho total de la escama (Fig. 3.3 a), mientras que en los individuos de los ABC y el SAM la barra abarca más de la mitad del ancho de la escama (Fig. 3.3b-c). Si bien las escamas del cinturón de *Ischnochiton* sp. se encuentran erosionadas o sucias, impidiendo contar con precisión el número de estrías, el patrón de éstas muestra que superan las 12 estrías que se encuentran en el cinturón de *I. erythronotus* y que sí se pueden contar en el caso de los individuos de los ABC y el SAM.

Rádula

Descripción. Primer diente lateral con un borde apical cóncavo liso. Dientes laterales mayores con tres cúspides, la cúspide externa es más grande que las otras dos. El diente central es delgado en la mitad inferior, se ensancha gradualmente hacia el ápice.

Observación

La rádula de *Ischnochiton* sp. (Fig. 3.4, 1) presenta el primer diente lateral (a) aplanado en la parte apical, y con 3-4 muescas en la periferia. El diente lateral mayor (b) es tricúspide, las cúspides aumentan de tamaño de la zona lateral a la central. La zona apical del diente central (c) es redondeada (indicada con la flecha) en la parte apical. Mientras tanto la rádula de *I. erythronotus* (Fig. 3.4, 2) presentan el primer diente lateral con la parte apical lisa y ligeramente cóncava. El diente lateral mayor (a) también es tricúspide pero solo la cúspide lateral es más pequeña que las dos centrales (b), el diente central (c) presenta un ápice redondeado (señalado con la flecha).

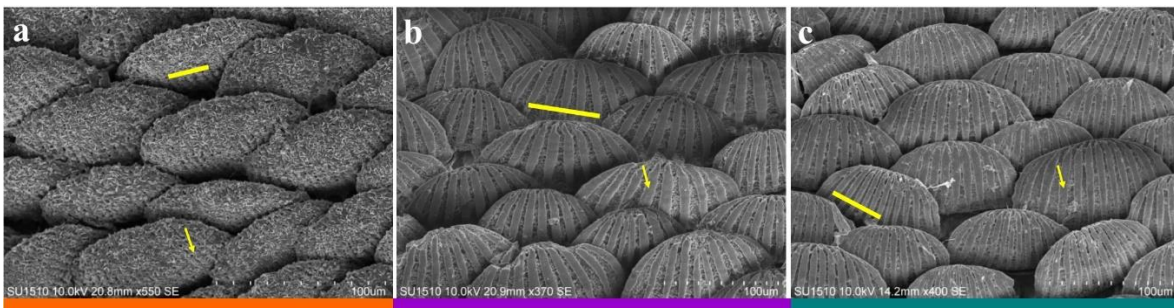


Figura 3.3. Escamas del cinturón de: a- Mocambo (Mo), Sistema Arrecifal Veracruzano; b- Arenas (An), arrecifes del banco de Campeche y c- Akumal (Ak), Sistema Arrecifal Mesoamericano. Las flechas señalan las estrías de las escamas y las líneas se extiende a lo largo de cinco de estas estrías.

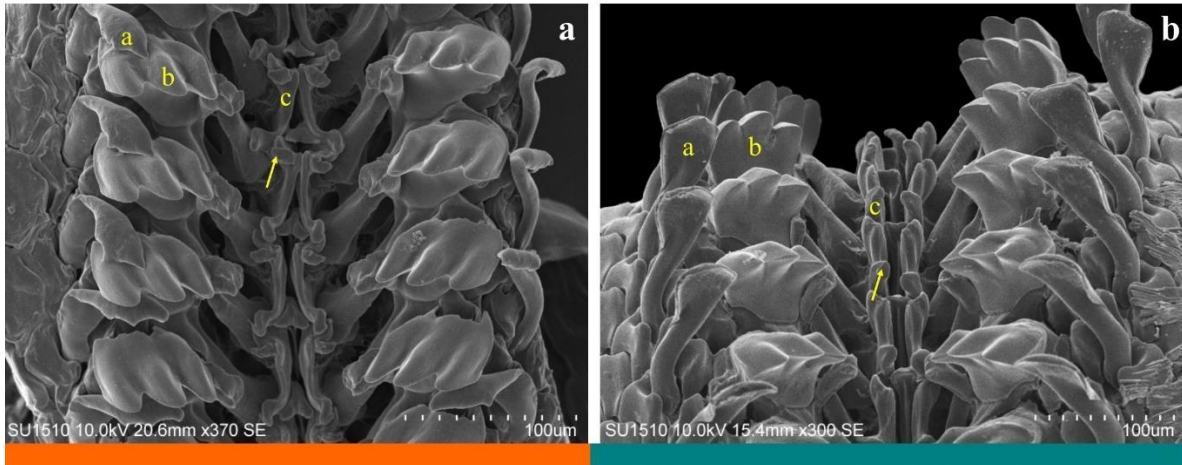


Figura 3.4. Detalle de la rádula a- *Ischnochiton* sp. de Mocambo (Mo), Sistema Arrecifal Veracruzano; y b- *I. erythronotus* de Xcalak (Xc), Sistema Arrecifal Mesoamericano. Se señalan los dientes que pueden distinguirse y compararse: a- diente lateral, b- diente tricúspide, c- diente central. Las flechas señalan la zona apical del diente central.

DISCUSIÓN

La variedad de procesos biológicos produce diferencias en la forma entre individuos, así como en términos de diversificación evolutiva (Zelditch et al., 2012). El objetivo de este capítulo fue diferenciar las especies del clado de *I. erythronotus* debido a la forma del cuerpo de los individuos. Si bien todos los poliplacóforos mantienen la forma general de una concha dividida en ocho placas rodeadas por un cinturón, en algunos grupos existen ciertas variaciones; *Cryptoconchus floridanus* por ejemplo, se caracteriza por presentar un cinturón muy amplio que ocupa casi todo el cuerpo (García-Ríos, 2003; Redfern, 2013). En las especies del género *Ischnochiton* el largo del cuerpo es casi el doble del ancho, y las valvas ocupan más de la mitad de ancho del cuerpo (Kaas y Van Belle, 1987). Aunque resulta sencillo hacer esa generalización para el género, los resultados de morfometría geométrica muestran que, en el caso del clado de *I. erythronotus* la forma del cuerpo completo resultó ser la mejor vista para separar las especies.

En las descripciones de las especies del género *Ischnochiton* y en particular de algunas de las especies que se distribuyen en el mar Caribe (e.g. *I. erythronotus*, *I. striolatus*, *I. papillosus*, *I. hartmeyeri*, *I. pseudovigaratus* e *I. kaasi*) incluyen la pendiente del área posmucronal. Sin embargo, se trata de una descripción subjetiva o poco precisa. Por ejemplo, en las descripciones de Kaas y Van Belle (1987) y García-Ríos (2003) se incluyen palabras como: pendiente suave, cóncava, marcadamente cóncava, muy pronunciada, escarpada, ligeramente cóncava o algo cóncava. Si bien, el adjetivo empleado depende de la especie también depende de la apreciación del autor que califica la pendiente. Los resultados obtenidos en la comparación de la forma de (PAP) en el clado de *I. erythronotus*, indican que no hay diferencias entre grupos geográficos ni genéticos. No obstante,

vale la pena mencionar que sí fue útil incluir esta vista en los análisis realizados, pues la pendiente del área posmucronal sí debe observarse al hacer la identificación de las especies de quitones. En el caso de las especies de *Ischnochiton* del Caribe, según los resultados de este trabajo y la vaga descripción en las claves de especies, es probable que se trate de un carácter diagnóstico a nivel de género y no de especies.

En la valva V los *landmarks* utilizados fueron elegidos a partir de las líneas de las cicatrices musculares observadas en el articulamento (vista dorsal de la valva), se incluyó además la hendidura de inserción de la zona lateral. Se sabe que las hendiduras de inserción son marcas de la innervación de los estetos en los surcos radiales presentes en el tegumento (Eernisse et al., 2007). No obstante, podrían estar relacionadas a otras estructuras que por supuesto no han sido evaluadas en este trabajo. El número en las hendiduras de inserción también ha sido un carácter morfológico utilizado en la descripción de las especies, sin embargo, algunos autores señalan que no se trata de un buen carácter en la definición de éstas (Eernisse et al., 2007). Mientras que sí se ha considerado como un carácter plesiomórfico en la separación de grandes grupos de quitones como en el caso del orden Lepidopleurida, se definen entre otras cosas por carecer de hendiduras de inserción o presentarlas poco desarrolladas (Sigwart, 2009).

En este caso, los resultados obtenidos en la prueba de alometría mediante el ANCOVA son significativos. Esto significa que el tamaño de los quitones afecta la forma de su cuerpo. En el presente estudio solo se han evaluado a dos especies que se han logrado diferenciar con la ayuda de análisis de morfometría geométrica, pero tal herramienta podría emplearse con las otras especies del género y un análisis con contrastes independientes ayudaría a marcar el cambio de la forma en la filogenia (Klingenberg y Marugán-Lobón, 2013). Lo anterior, ya que los cambios evolutivos dependen de variación heredable en los rasgos morfológicos y en varios estadios de la historia de vida producidos por variación ontogenética. Si bien el tamaño del centroide es un concepto matemático, también es un concepto que se correlaciona con la talla y forma de los organismos. En este sentido la variación en milímetros puede no parecer significativa, pero al tratarse de un quitón que alcanza una talla máxima de 15mm (García-Ríos, 2003; Kaas y Van Belle, 1990), un par de milímetros representan un porcentaje importante, provocando una variación sustancial entre los grupos en cuestión. La alometría entre especies es un reflejo de la diferenciación en el desarrollo de éstas (Higginson et al., 2015). A su vez, la diferenciación de las especies depende del aislamiento reproductivo y la diferenciación morfológica, aunque esta última puede no estar presente entre especies cercanas, siendo más común que ocurra en invertebrados Nei, 1975.

Baxter y Jones (1986), observaron un crecimiento isométrico en las valvas intermedias del chitón *Tonicella marmorea*, mientras que el análisis del cuerpo completo, en sus relación largo y ancho la misma especie presenta un crecimiento alométrico, tal resultado en consiste con el obtenido con *Chiton stokesii* (Patiño-Montoya y Abella-Medina, 2017). En el clado de *I. erythronotus* cuando se evaluó el cuerpo completo y la PAP, los análisis de alometría fueron significativos, sin embargo, no fue así en el caso de la valva V. La alometría en los quitones se debe a la forma de las placas y a las altas tasas de crecimiento diferencial, así como el tipo de hábitat donde se encuentran los organismos (Baxter y Jones, 1986; Patiño-Montoya y Abella-Medina, 2017). Debido a la estructura de la concha de los quitones, se ha propuesto que la alometría del cuerpo no puede evaluarse considerando estructuras por separado como pasa en otros grupos de moluscos como gasterópodos y bivalvos (Baxter y Jones, 1986; Patiño-Montoya y Abella-Medina, 2017).

El margen posterior de la valva cefálica de los quitones tiene forma de V invertida, además, en la descripción de las especies se hace referencia al ancho y largo de tal valva, las claves incluyen frases como la valva cefálica: “es más larga que ancha”, “es más ancha que larga”, “aproximadamente larga como el doble de ancha”. Con lo anterior queda claro que el ángulo de la “V invertida” que se forma en la valva cefálica no siempre es igual en todos los poliplacóforos y por supuesto difícil de diferenciar a simple vista. Los resultados de la diferencia en el ángulo de la valva cefálica muestran diferencias significativas tanto entre poblaciones como entre arrecifes, por lo que no parece ser un buen carácter para identificar especies ya que existe variación dentro de ellas.

Vale la pena además recordar que es la posición del mucrón lo que marca el área premucronal y posmucronal, de ahí el nombre que reciben estas zonas, además presentan una escultura del tegumento diferente. El mucrón en los quitones no siempre se encuentra en el centro de la valva anal, algunos grupos presentan esta estructura en la parte anterior o posterior de tan valva. Los análisis de la forma del ángulo del “triángulo” que se forma a partir del mucrón mostraron que esta estructura es diferente en los individuos de los distintos sistemas arrecifales. Sin embargo, aquí también cuenta la diferencia entre el ancho y largo de la valva anal que presentan los organismos. La forma de las valvas cefálica y anal en los quitones es diferente incluso poblacionalmente, sin embargo, se trata de una característica de distinguir a simple vista. En este caso fue posible analizarla debido a que se utilizó un recurso matemático. Se recomienda, sin embargo, analizar esta estructura entre especies más alejadas taxonómicamente e inclusive entre especies de diferentes géneros.

Morfología vista con MEB

La identificación de los poliplacóforos tradicionalmente se ha hecho examinando la escultura fina de las valvas y otras estructuras duras. En el género *Ischnochiton* existen pequeñas diferencias entre especies como son los patrones en la escultura en las zonas centrales de las valvas, en los patrones en las escamas del cinturón y en la forma de los dientes centrales de las rádulas (Owada, 2018). En el estudio del clado de *I. erythronotus* las diferencias que pudieron observarse corroboraron los resultados obtenidos mediante los datos genéticos y de morfometría geométrica con los que se reafirma la existencia de grupos que pertenecen a especies diferentes. Se observaron diferencias en el patrón de la escultura, en *Ischnochiton* sp se observó una escultura más tenue tanto en las zonas laterales de las valvas intermedias, como en la valva cefálica y el área posmucronal, que la observada en *I. erythronotus*. Además, el número de estrías que presentan las escamas del cinturón es mayor en *Ischnochiton* sp. que en *I. erythronotus*.

DISCUSIÓN GENERAL

Los datos genéticos y la morfometría geométrica del cuerpo de los quitones, así como la escultura fina de las valvas, indican que los quitones de las poblaciones del SAV conforman una especie distinta a las descritas hasta ahora dentro del género *Ischnochiton*. Cabe mencionar que los individuos incluidos en este estudio fueron los únicos quitones encontrados en la revisión de seis arrecifes y tres playas ubicadas en Veracruz. Además, las colecciones biológicas consultadas tampoco albergan individuos de *I. erythronotus* para Veracruz. Si bien se han reportado otras especies de quitones para Veracruz, estos registros corresponden a playas ubicadas al sur del estado. En otras palabras, si no se incluyen otras especies de *Ischnochiton* u otras poblaciones de *I. erythronotus* de Veracruz es porque los quitones que se incluyeron fueron los únicos quitones que pudieron encontrarse durante el trabajo de recolección y la revisión de las colecciones malacológicas.

La importancia de haber incluido el flujo génico en distintos grupos del clado de *I. erythronotus* reside en que fue posible identificar a las poblaciones del SAV como unidades que según los datos de este trabajo corresponden a unidades evolutivas diferentes a las que se encuentran en el SAM y los ABC.

De las localidades revisadas en Veracruz, La Gallega fue la localidad donde se encontró el mayor número de quitones, con un total de 31 individuos. Este sitio fue el único arrecife del Sistema Arrecifal Veracruzano que pudo incluirse en este trabajo, pero también fue el sitio en donde se observó mayor contaminación. Aunque no se midió ningún parámetro fisicoquímico indicador de

esta condición, los sustratos duros donde se encontraron los individuos fueron solo pedacearía de coral muerto que se encontraban rodeados de pastos marinos.

Owada (2018) construyó la filogenia del género *Ischnochiton* basándose en seis especies distribuidas en Japón. Incluyó cuatro marcadores genéticos e incluyó fotografías de MEB. Si bien los datos genéticos fueron determinantes en sus resultados, observó que en el género *Ischnochiton* existen pequeños detalles como cambios en los patrones en la escultura de las valvas, las escamas del cinturón, e inclusive en la forma de algunos dientes de las rádulas. Tales caracteres son imposibles de diferenciar en el campo, pero son importantes de incluir en la descripción de las especies, pues son características que están variando entre ellas. En el caso de este estudio, los resultados genéticos son consistentes con los obtenidos con la morfometría geométrica y bastaría con tener solo alguno de ellos. Sin embargo, el tener varios genes y varias estructuras morfológicas en los análisis, además de acercamientos de la escultura fina de las valvas da un mayor soporte en los resultados obtenidos donde se propone que el grupo de quitones de las poblaciones del SAV son una especie diferente de *I. erythronotus*.

CONCLUSIONES

La forma del cuerpo completo resultó ser el carácter más informativo para evaluar en la diferenciación de los poliplacóforos. Tanto el cuerpo completo como la valva V son buenos caracteres para diferenciar a los quitones de los distintos sistemas arrecifales. Mientras que no existe diferencias en la forma de la pendiente del área posmucronal entre los individuos de éstos.

El cuerpo completo y la pendiente del área posmucronal presentaron resultados significativos que indican que existe crecimiento alométrico entre grupos propuestos como especies diferentes y entre sistemas arrecifales.

Existen diferencias significativas en el ángulo formado por las valvas cefálica y anal, sin embargo, no son estructuras que ayuden a separar a los grupos de las distintas especies.

La escultura fina en la escultura del tegumento, los dientes laterales de la rádula y las estrías en las escamas del cinturón ayudan a diferenciar a las especies de quitones del clado de *I. erythronotus*.

REFERENCIAS CITADAS

- Alarcón-Chavira, E. (2014). Sistemática y distribución de quitones (Mollusca: Polyplacophora) de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 124 p.
- Bandelt, H. J., Forster, P. y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Baxter, J. M. y Jones, A. M. (1986). Allometric and morphological characteristics of *Tonicella marmorea* (Fabricius, 1780) populations (Mollusca: Polyplacophora: Ischnochitonidae). *Zoological journal of the Linnean Society*, 88(2), 167-177.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D. y Sayers, E. W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 46(D 1), D41-D47.
- Bonfitto, A., Dell'Angelo, B., Evangelisti, F. y Sabelli, B. (2011). The genus *Acanthochitona* (Mollusca: Polyplacophora) in the Mediterranean Sea: morphological and molecular data. *Scientia Marina*, 75(1), 171-180.
- Carrillo, L., Johns, E. M., Smith, R. H., Lamkin, J. T., y Largier, J. L. (2015). Pathways and hydrography in the mesoamerican barrier reef system part 1: circulation. *Continental Shelf Research*, 109, 164-176.
- Carrillo, L., Lamkin, J. T., Johns, E. M., Vásquez-Yeomans, L., Sosa-Cordero, F., Malca, E., Smith R. H. y Gerard, T. (2017). Linking oceanographic processes and marine resources in the western Caribbean Sea Large Marine Ecosystem Subarea. *Environmental development*, 22, 84-96.
- Cartes, J. E. (2009). Adaptations to life in oceans. Pelagic macrofaunal. En Duarte, C. M. y Helgueras, A. L. (Eds.) *Marine Ecology*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Singapore. 168-169 p.
- Castillo-Rodríguez, Z. G. (2014). Biodiversidad de moluscos marinos en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 419-430.
- Cayuela, L. (2010). Modelos lineales: Regresión, ANOVA y ANCOVA. *Eco Lab, Centro Andaluz de Medio Ambiente, Universidad de Granada. Notas de clase*, 1-57 pp.
- Cock, A. G. (1966). Genetical aspects of metrical growth and form in animals. *The Quarterly Review of Biology*, 41(2), 131-190.
- Connors, M. J., Ehrlich, H., Hog, M., Godeffroy, C., Araya, S., Kallai, I., ... y Ortiz, C. (2012). Three-dimensional structure of the shell plate assembly of the chiton *Tonicella marmorea* and its biomechanical consequences. *Journal of structural biology*, 177(2), 314-328.

- Cruz, R. A. L., Pante, M. J. R., y Rohlf, F. J. (2012). Geometric morphometric analysis of shell shape variation in *Conus* (Gastropoda: Conidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 165(2), 296-310.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772.
- David, B. y Laurin B. (1996). Morphometrics and cladistics: measuring phylogeny in the sea urchin *Echinocardium*. *Evolution* 50: 348–359.
- David, B., Richards, T., McNiven, I. J. Mialanes, J., Aplin, K., ... y Barker, B. (2016). *The Caution bay project field and laboratory methods*. Capítulo 9. En Richards, T., David, B., Aplin, K. y McNiven, I. J. (Eds.). *Archaeological Research at Caution Bay, Papua New Guinea: Cultural, Linguistic and Environmental Setting*. Archaeopress. 32 p.
- Doonan, J., Beatty, G. E., Sigwart, J. D., y Provan, J. (2012). Extensive local-scale gene flow and long-term population stability in the intertidal mollusc *Katharina tunicata* (Mollusca: Polyplacophora). *Biological journal of the Linnean Society*, 106(3), 589-597.
- Eernisse, D. J. (2007). *Chitons*. Denny, M. W. y Gaines, S. D. (Eds.). *Encyclopedia of Tidepools and Rocky Shores*, University of California Press, Berkeley, California 127-133 pp.
- Eernisse, D. J., Clark, R. N. y Draeger, A. (2007). *Polyplacophora*. Carlton, J. T. (Ed.). *Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon*, 4th Ed. University of California Press, Berkeley, California 701-713 pp.
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E. y Souza, V. (2013). Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1), 42-56.
- Excoffier, L. y Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Felder, D. L., y Camp, D. K. (Eds.). (2009). *Gulf of Mexico origin, waters, and biota: Biodiversity*. Texas A&M University Press.
- Fernandez, C. Z., Vendrasco, M. J., y Runnegar, B. (2007). Aesthete canal morphology in twelve species of chiton (Polyplacophora). *Veliger*, 49(2), 51-69.
- Fernández-Pérez, J., Froufe, E., Nantón, A., Gaspar, M. B., y Méndez, J. (2017). Genetic diversity and population genetic analysis of *Donax vittatus* (Mollusca: Bivalvia) and phylogeny of

the genus with mitochondrial and nuclear markers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 197, 126-135.

- Freeman, S. y Herron, J. C. (2002). *Análisis evolutivo*. Madrid: Prentice Hall.
- Fu, Y. X. y Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Galván-Quesada, S., Doadrio, I., Alda, F., Perdices, A., Reina, R. G., Varela, M. G., ... y Domínguez-Domínguez, O. (2016). Molecular phylogeny and biogeography of the amphidromous fish genus *Dormitator* Gill 1861 (Teleostei: Eleotridae). *PLoS one*, 11(4), e0153538.
- García-Ríos, C. I. (2003). *Los quitones de Puerto Rico*. San Juan, Puerto Rico. Isla Negra, 208pp.
- García-Ríos, C. y Álvarez-Ruíz, M. (2011). Diversidad y microestructura de quitones (Mollusca: Polyplacophora) del Caribe de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 59(1): 129-136.
- García-Ríos, C., Pérez, N. M. P., López, J. F. y Fuentes, F. A. (2014). Calibrating the chitons (Mollusca: Polyplacophora) molecular clock with the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase I gene. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 193-207.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. y Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic acids research*, 38(suppl_2), W695-W699.
- Gracia, C. A., Díaz, J. M. y Ardila N. E. (2005). Quitones (Mollusca: Polyplacophora) del Mar Caribe Colombiano. *Biota colombiana*. 6(1): 117-125.
- Grandidge, A. F. (2011). A molecular study of the chiton *Ischnochiton striolatus* (Gray, 1828) from Isla de Margarita, Nueva Esparta, Venezuela. Tesis de maestría. University of Rhode Island.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., y de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
- Hedrick, P. (2011). *Genetics of populations*. Jones & Bartlett Learning, 675pp.
- Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E., y Palumbi, S. R. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of marine science*, 70(1), 273-290.
- Hernández, R. (2015). Estudio faunístico de los moluscos del arrecife “La Perla del Golfo”, Veracruz, México, Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 94 pp.

- Higginson, D. M., Badyaev, A. V., Segraves, K. A., y Pitnick, S. (2015). Causes of discordance between allometries at and above species level: an example with aquatic beetles. *The American Naturalist*, 186(2), 176-186.
- Johnson, D. R., Perry, H. M. y Lyczkowski-Shultz, J. (2013). Connections between Campeche Bank and red snapper populations in the Gulf of Mexico via modeled larval transport. *Transactions of the American Fisheries Society*, 142(1), 50-58.
- Kaas, P. y Van Belle, R. A. (1985a). *Monograph of living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*, Volume 1, Orden Neoloricata: Lepidopleurina. E. J. Brill, Leiden, London, 240 pp.
- Kaas, P. y Van Belle, R. A. (1985b). Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora), Volume 2 Suborder Ischnochitonina. Ischnochitonidae: Schizoplacinae, Callochitoninae and Lepidochitoninae. In *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*, Volume 2 Suborder Ischnochitonina. Ischnochitonidae: Schizoplacinae, Callochitoninae and Lepidochitoninae. BRILL.
- Kaas, P. y Van Belle, R. A. (1987). *Monograph of Living Chitons (Mollusca: Polyplacophora)*, Volume 3, Suborder Ischnochitonina: Ischnochitonidae: Chaetopleurinae, & Ischnochitoninae (pars), Adicional a vols. 1 & 2. E. J. Brill, Leiden, London, 302 pp
- Kaas P. y Van Belle, R. A. (1990). *Monograph of living chitons (Mollusca: Polyplacophora)* Vol. 4 Suborder Ischnochitonina. Ischnochitonidae: Ischnochitoninae (continuación) Adicional a vols. 1, 2 y 3 E. J. Brill, Leiden, London, 298 pp.
- Kaas, P. y Van Belle, R. A. (1994). Monograph of living chitons (Mollusca: Polyplacophora), Vol. 5, Suborder Ischnochitonina: Ischnochitonidae (concluded); Callistoplacinae, Mopalidae, additions to vols. 1-4. *EJ Brill, Leiden, Holanda*, 402 pp.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... y Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kelly, R. P., Oliver, T. A., Sivasundar, A., y Palumbi, S. R. (2010). A method for detecting population genetic structure in diverse, high gene-flow species. *Journal of Heredity*, 101(4), 423-436.
- Kendall, D. G. (1977). The diffusion of shape. *Advances in applied probability*, 9(3), 428-430.
- Klingenberg, C. P., y Zimmermann, M. (1992). Static, ontogenetic, and evolutionary allometry: a multivariate comparison in nine species of water striders. *The American Naturalist*, 140(4), 601-620.

- Klingenberg, C. P. (2010). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 623.
- Klingenberg, C. P. y Marugán-Lobón, J. (2013). Evolutionary covariation in geometric morphometric data: analyzing integration, modularity, and allometry in a phylogenetic context. *Systematic biology*, 62(4), 591-610.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lecocq, T., Vereecken, N. J., Michez, D., Dellicour, S., Lhomme, P., Valterova, I. ... y Rasmont, P. (2013). Patterns of genetic and reproductive traits differentiation in mainland vs. Corsican populations of bumblebees. *PLoS One*, 8(6), e65642.
- Li, Q., Kong, L., Yu, H., Zheng, X., Yu, R., Dai, L., ... y Feng, Y. (2016). DNA barcoding reveal patterns of species diversity among northwestern Pacific molluscs. *Scientific reports*, 6, 33367.
- Liversage, K. y Benkendorff, K. (2017). The first observations of *Ischnochiton* (Mollusca, Polyplacophora) movement behaviour, with comparison between habitats differing in complexity. *PeerJ*, 5: e4180.
- Liuzzi, M. G. (2014). *Polyplacophora*. En Calcagno, J. A. (Ed.). Los invertebrados marinos. Vazquez Mazzini Editores, Buenos Aires, 119-131.
- Lyons, W. G. (1988). A review of Caribbean Acanthochitonidae (Mollusca: Polyplacophora) with descriptions of six new species of *Acanthochitona* Gray, 1821. *American Malacological Bulletin* 6(1): 79-114.
- Lyons, W. G. y F. Moretzsohn. (2009). Polyplacophora. En Felder, D. L. y Camp, D. K. (Eds.). (2009). Gulf of Mexico Origin, waters and biota, Volume I, Biodiversity. 559-749 pp.
- Mikkelsen, N. T. y Todt, C. (2018). One or many? Molecular versus morphological diversity in the aplacophoran *Chaetoderma nitidulum* Lovén, 1844 (Mollusca: Caudofoveata). *Journal of Molluscan Studies*, 84(2), 113-131.
- Nei, M. (1975). *Molecular population genetics and evolution*. North-Holland Publishing Company.
- Nei, M. y Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press.
- Nielsen, R. y Slatkin, M. (2013). *An Introduction to Population Genetics*, Theory and applications. Sinauer Associates, USA, 287pp.

- Okusu, A., Schwabe, E., Eernisse, D. J. y Giribet, G. (2003). Towards a phylogeny of chitons (Mollusca, Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(4), 281-302.
- Owada, M. (2018). Phylogenetic Relationships Among Japanese Species of the Genus *Ischnochiton* (Polyplacophora: Ischnochitonidae), Including a New Species. *Zoological science*, 35(3), 281-291.
- Palumbi, S. R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual review of ecology and systematics*, 25(1), 547-572.
- Patiño-Montoya, A. y Abella-Medina, C. (2017). Variación morfométrica de *Chiton stokesii* (Polyplacophora: Chitonidae) en un gradiente intermareal del Parque Nacional Natural Isla Gorgona. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 7(4), 284-290.
- Peakall, R. y Smouse P. E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pérez-Cervantes, E., Navarro-Espinoza, E., Estrada-Saldívar, N. A., Espinosa-Andrade, N., Melo-Merino, S. M. Rivas-Soto, M. y Álvarez-Filip, L. (2017). *Estado de conservación de los arrecifes de coral de la Península de Yucatán*. 24 pp.
- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L. Rocha, A. y Salas R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 415-435.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.
- Pritchard, J. K. y Wen, W. (2004). Documentation for STRUCTURE 2.0.
- Rambaut, A. y Drummond, A. (2017). FigTree version 1.4. 0. 2012.
- Reyes-Gómez, A. (2003). Chitons in mexican waters. *Bolletino Malacologico*. 5: 69-82.
- Reyes-Gómez, A., Ortigosa, D. y Simões, N. (2017). Chitons (Mollusca, Polyplacophora) from Alacranes Reef, Yucatan, Mexico. *ZooKeys*, (665), 1.
- Redfern, C. (2001). *Bahamian seashells: a thousand species from Abaco, Bahamas*. Bahamianseashells.com. Florida, 571 pp.
- Redfern, C. (2013). *Bahamian seashells: 1161 species from Abaco, Bahamas*. Bahamianseashells. Com, Incorporated. Florida, 501 pp.

- Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of ecology and Systematics*, 21(1), 299-316.
- Rohlf, F. J. (2015). The tps series of software. *Hystrix*, 26(1).
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic interference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Rufino, M. M., Gaspar, M. B., Pereira, A. M. y Vasconcelos, P. (2006). Use of shape to distinguish *Chamelea gallina* and *Chamelea striatula* (Bivalvia: Veneridae): linear and geometric morphometric methods. *Journal of Morphology*, 267(12), 1433-1440.
- Sanvicente-Añorve, L., Zavala-Hidalgo, J., Allende-Arandía, M. E. y Hermoso-Salazar, M. (2014). Connectivity patterns among coral reef systems in the southern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 498, 27-41.
- Sanvicente-Añorve, L., Rodríguez-Vázquez, R., Lemus-Santana, E., Alatorre-Mendieta, M. y Reguero, M. (2018). Variaciones estacionales de la comunidad de quitones (Mollusca: Polyplacophora) en una zona intermareal rocosa del sur del Golfo de México. *Revista de biología marina y oceanografía*, 53(1), 19-26.
- Schwabe, E. (2005). A catalogue of Recent and fossil chitons (Mollusca: Polyplacophora). Addenda. *Novapex*, 6(4), 89-105 p.
- Sheets, H. D. (2003). IMP, Integrated Morphometrics Package. Department of Physics, Canisius College, Buffalo, NY.
- Sigwart, J. D. (2009). Morphological cladistic analysis as a model for character evaluation in primitive living chitons (Polyplacophora, Lepidopleurina). *American Malacological Bulletin*, 27(1/2), 95-104.
- Sirenko, B. I. (1993). Revision of the system of the order Chitonida (Mollusca: Polyplacophora) on the basis of correlation between the type of gills arrangement and the shape of the chorion processes. *Ruthenica*, 3, 93-117.
- Sirenko, B. I. (2006) New outlook on the system of chitons (Mollusca: Polyplacophora). *Venus* 65: 27-49
- Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure. *Ecological genetics*, 3-17.

- Suárez, C. J. L. (2018). Análisis de diversidad de moluscos y crustáceos en la playa rocosa de Balzapote, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 99pp.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Todt, C., Okusu, A., Schander, C. y Schwabe, E. (2008). Solenogastres, Caudofoveata, and Polyplacophora. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*, 4, 71-96.
- Tunnell Jr, J. W., Chávez, E. A., y Withers, K. (2010). *Arrecifes coralinos del sur del Golfo de México* (No. 577.789 C657).
- Vaux, F., Crampton, J. S., Marshall, B. A., Trewick, S. A. y Morgan-Richards, M. (2017). Geometric morphometric analysis reveals that the shells of male and female siphon whelks *Penion chathamensis* are the same size and shape. *Molluscan Research*, 37(3), 194-201.
- Villamor, A., Costantini, F., y Abbiati, M. (2014). Genetic structuring across marine biogeographic boundaries in rocky shore invertebrates. *PLoS One*, 9(7), e101135.
- Wares, J. P., Gaines, S., y Cunningham, C. W. (2001). A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution*, 55(2), 295-306.
- Yearsley, J. M. y Sigwart, J. D. (2011). Larval transport modeling of deep-sea invertebrates can aid the search for undiscovered populations. *PLoS One*, 6(8), e23063.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., y Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press.

APÉNDICE 1

Estructuras duras de los quitones dentro de los arrecifes

Valva cefálica y anal

Los individuos del Sistema Arrecifal Veracruzano que han sido nombrados *Ischnochiton* sp. tienen la valva cefálica y el área posmucronal de la valva anal con una escultura tenue formada de cordones concéntricos en forma de zigzag, el área premucronal de la valva anal tiene este mismo patrón de cordones en zig zag pero son mucho más tenue y casi desaparece en la zona cerca del mucrón (Fig. 3.5). Se observan tres individuos del SAV: Mr, Mo y PG, todos tienen el mismo patrón de la escultura. En la valva anal de PG los canales concéntricos se observan más marcados en el área posmucronal pero el patrón se conserva y los cordones tampoco llegan a ser elevados como en el caso de *I. erythronotus*.

En los individuos de los ABC (An y Ar) y el SAM (Mu, Ak, Xc) la escultura del tegumento tanto de la valva cefálica como de la valva anal es marcada (Fig. 3.5), los cordones concéntricos son elevados y las ralladuras radiales provocan un aspecto lobulado en éstos, pero el patrón es el mismo que el descrito en la parte anterior de esta sección. Los cordones longitudinales del área premucronal de la valva anal no aparecen tan marcados en todos los individuos (ej. MU), sin embargo, puede deberse a erosión ya que si se observa detenidamente sí es posible observar los cordones que desaparecen cerca del área del mucrón. Aunque en este caso existe más variación en que tan marcada es la escultura del tegumento, el patrón que se observa es el mismo y en todos los casos coincide con lo descrito para *I. erythronotus*.

Valva intermedia (V)

La escultura del tegumento de la valva V también es más tenue en los individuos del SAV (Fig. 3.6, Mr, Mo, PG), las áreas laterales no están levantadas y el acercamiento permite observar que los estetos son todos del mismo tamaño. El individuo del Mr se observa muy erosionado ya que apenas es posible observar los estetos en el acercamiento, pero la fotografía de toda la valva permite observar que no hay diferencias en el patrón de la escultura (Fig. 3.6).

Una vez más los individuos de los ABC y el SAM (marcados con la barra morada y verde, respectivamente en la parte posterior de la Fig. 3.6) presentan cordones longitudinales que se desvanecen hacia la zona centro de la valva. Se incluyeron distintos acercamientos de los estetos fotografiados en las diferentes zonas de la valva V, sin embargo, en todos los casos presentados se observan megaloestetos (señalados con flechas) rodeados por microestetos (Fig. 3.6).

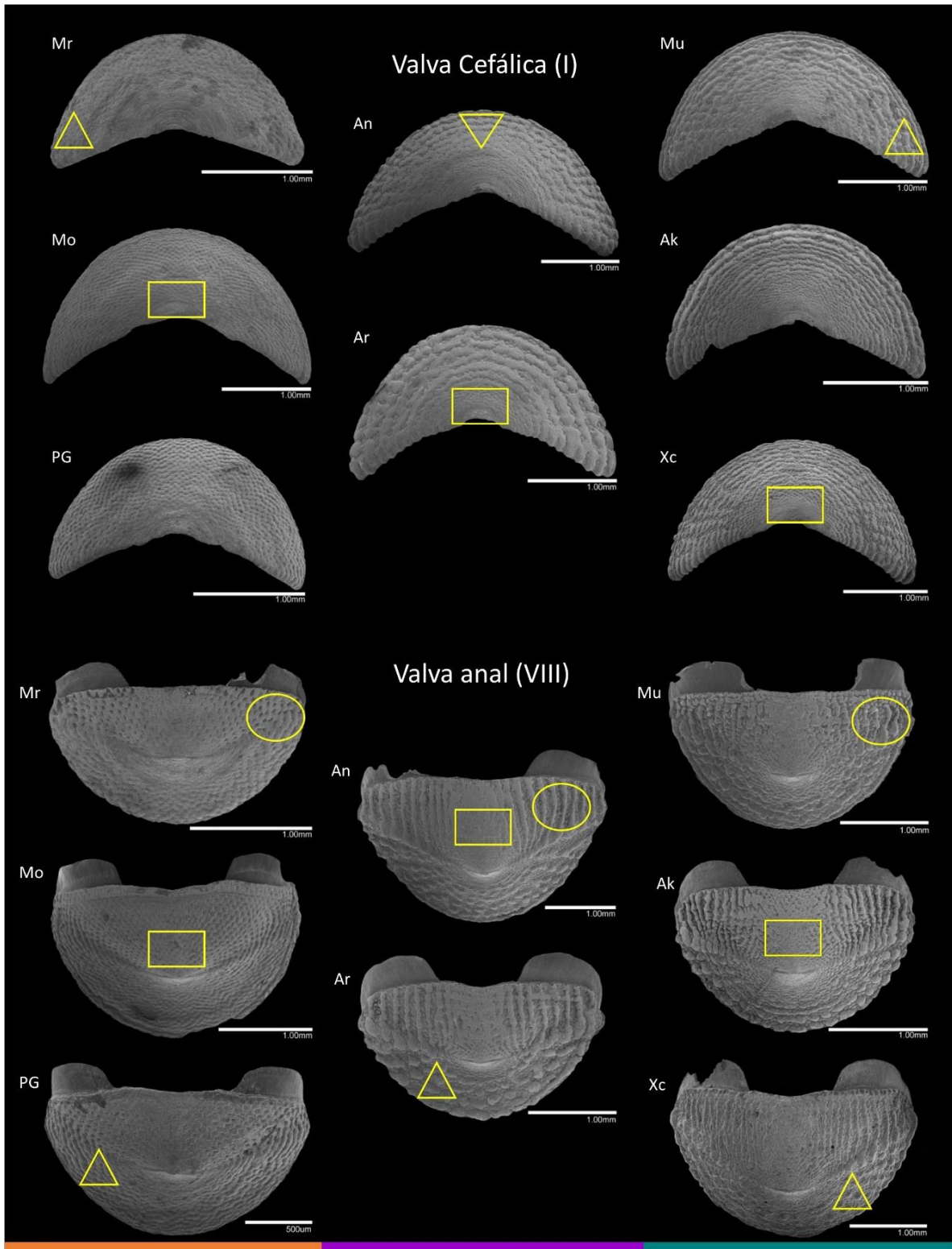


Figura 3.5. Comparación de la escultura del tegumento de las valva cefálica y anal, dentro de los sistemas arrecifales, cada fila corresponde a uno de ellos, se diferencian con los colores de la parte posterior: naranja-SAV, morado- ABC y verde- SAM. Los rectángulos encierran la zona intermedia de ambas valvas (cefálica y anal); los triángulos, los cordones concéntricos de la valva cefálica y el área posmucronal de la valva anal; los óvalos encierran los cordones longitudinales de la zona lateral del área premucronal de la valva anal.

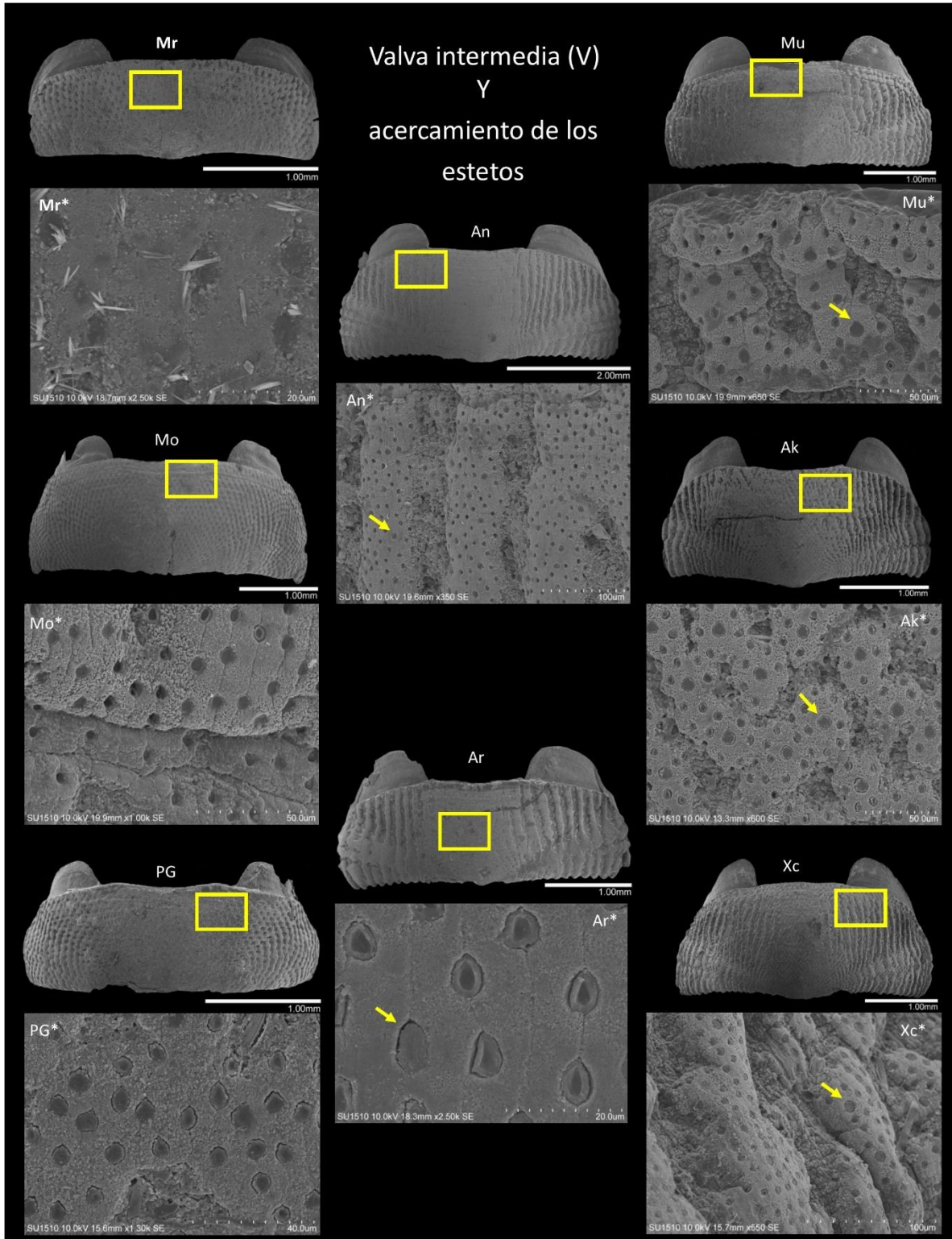


Figura 3.6. Escultura del tegumento de la valva intermedia (V), con distintos acercamientos de diferentes individuos dentro de los sistemas arrecifales, cada fila corresponde a uno de ellos, se diferencian con los colores de la parte posterior: naranja- SAV, morado- ABC y verde- SAM. Los rectángulos encierran la zona detallada para cada valva y las flechas señalan los megalostetos.

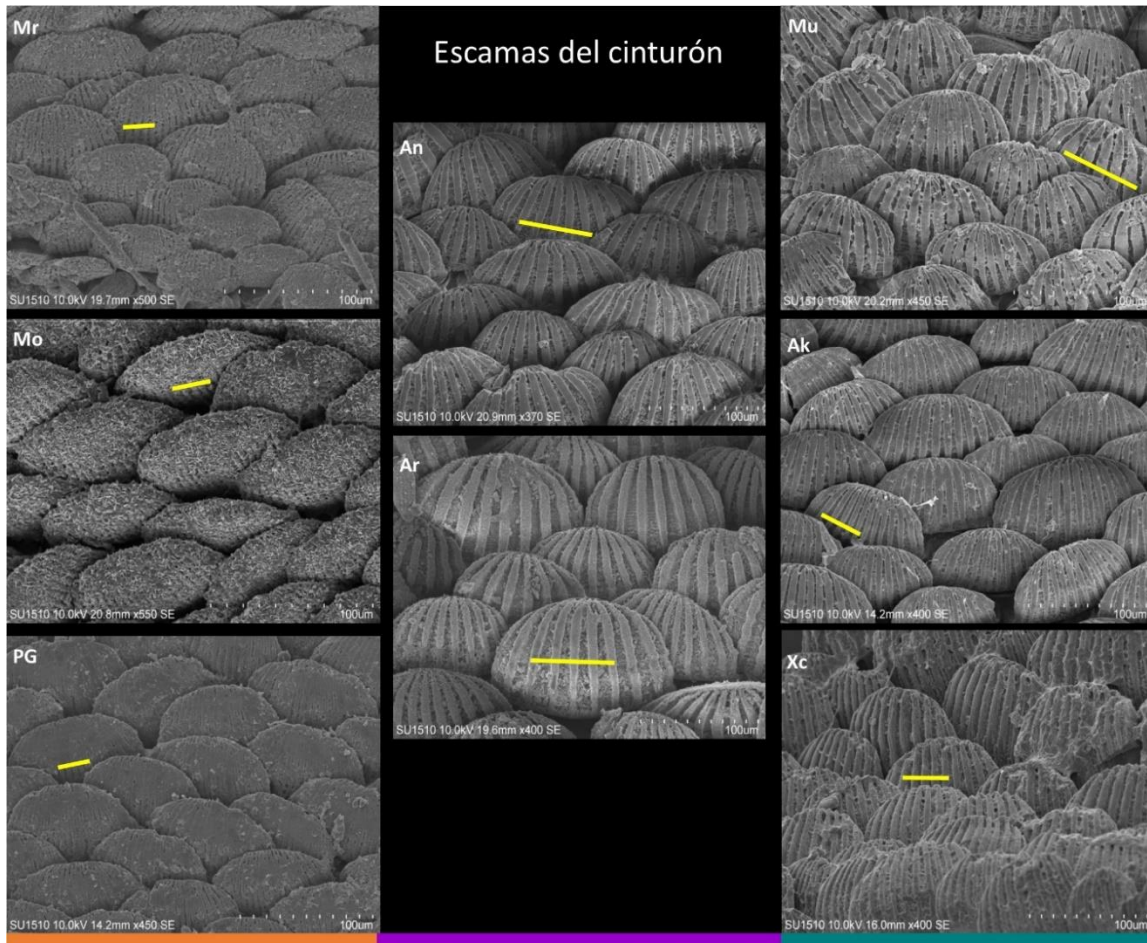


Figura 3.7. Escamas del cinturón de diferentes individuos dentro de los sistemas arrecifales, cada fila corresponde a uno de ellos, se diferencian con los colores de la parte posterior: naranja- SAV, morado- ABC y verde- SAM. Las líneas amarillas abarcan a lo ancho cinco estrías de la escama correspondiente.

Cinturón

En todos los individuos del SAV las escamas se observan con un patrón más estriado, es decir, las estrías se observan más delgadas que las que se observan en el cinturón de los quitones de los otros dos sistemas. Las líneas amarillas abarcan cinco de las estrías y en los tres individuos tales líneas se extienden a lo ancho de $1/5$ del ancho de la escama, aproximadamente. Mientras que en los individuos tanto de los ABC como del SAM las estrías de las escamas se observan más gruesas, y cinco de ellas abarcan más de la mitad del ancho de las escamas del cinturón (Fig. 3.7).

Rádula

Las fotografías de las rádulas de los ABC no permiten la observación de los dientes centrales, solo se aprecian los dientes tricúspides, que en ambos individuos la cúspide lateral es de menor tamaño respecta de las otras dos cúspides. Este patrón de las cúspides también se observa en los dientes de los individuos del SAM, donde además es posible observar los dientes laterales con forma de

espátula que aparecen con un perímetro liso en todos los casos. En el caso de los individuos del SAV las cúspides de los dientes aumentan de tamaño del centro a la zona lateral, además los dientes laterales se observan en forma de espátula, pero con un perímetro dentado.

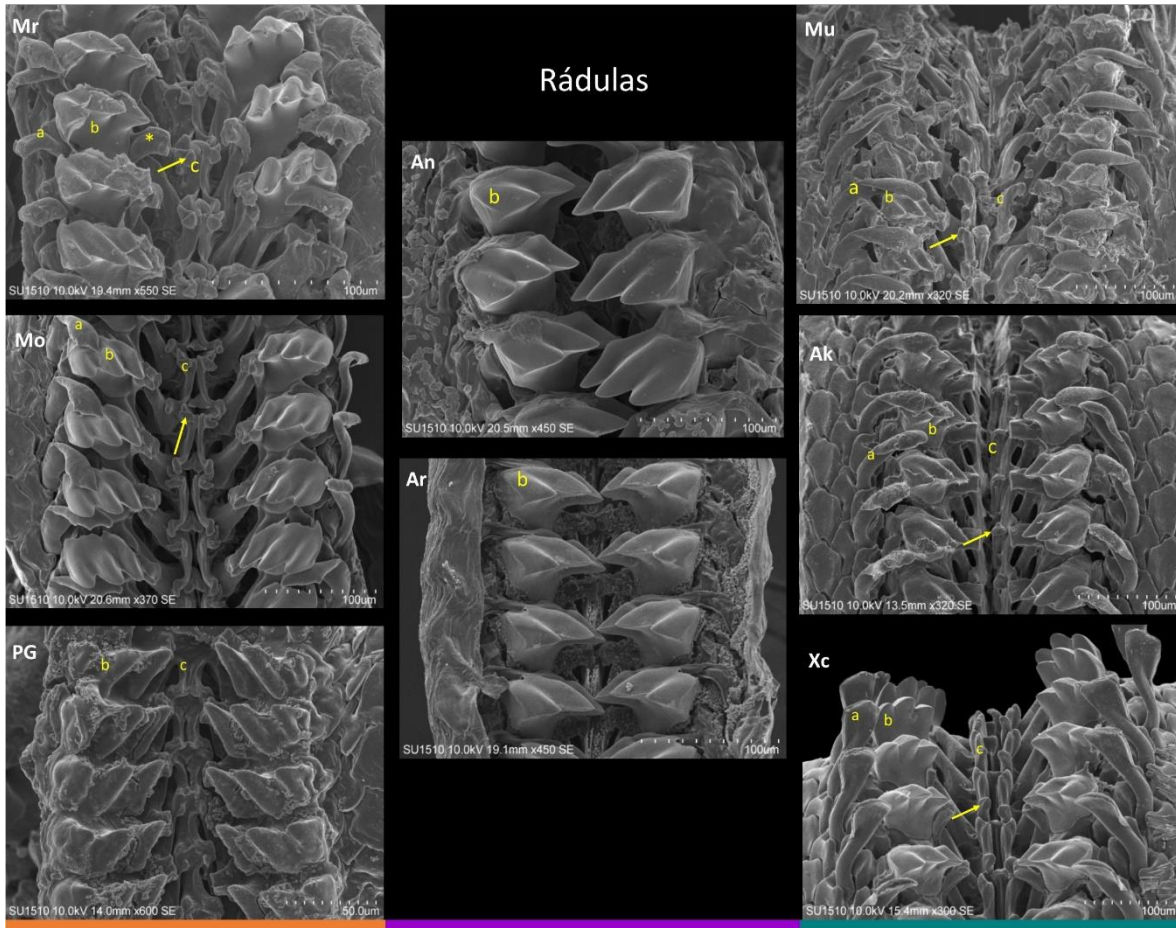


Figura 3.8. Detalles (MEB) de la rádula de individuos proveniente de: naranja) SAV; morado) ABC; verde) SAM. Marcas en la rádula: a- diente lateral; b- diente tricúspide; c- diente central. Flechas-zona apical del diente central.

ANEXOS

Anexo A. Total de individuos obtenidos y analizados en cada caso.

Tabla X. Relación del número total de individuos obtenidos en este estudio. Se especifica cuántos de ellos se utilizaron para cada gen y en que vista fueron fotografiados.

Arrecife	Localidad	Individuos	COI	16S	28S	Cuerpo completo	PAP	Valva V
SAV	El Morro	10	10	10	10	6	5	3
	Mocambo	3	3	3	3	2	3	3
	Gallega	13	13	13	13	6	10	3
ABC	La Perla	13	6	6	13	5	6	3
	Alacranes	16	3	13	11	5	9	---
	Arcas	21	11	15	11	7	10	3
SAM	Arenas	14	8	14	12	7	9	3
	Isla Mujeres	10	8	8	8	8	7	3
	Puerto Morelos	15	5	11	12	9	9	3
	Banco Chinchorro	7	---	---	---	---	---	---
	Akumal	10	10	10	10	7	10	3
	Xcalak	10	9	10	10	9	10	3

Capítulo 1

Anexo 1.1 Primers utilizados para el gen COI

Los primers LCO 1490 y HCO 2198 se utilizaron para los individuos de las poblaciones del SAV y que se han considerado *Ischnochiton* sp. Sin embargo, con estos primers no fue posible amplificar ni un solo individuo de *I. erythronotus* y tras muchas pruebas se obtuvieron resultados positivos al combinar el *reverse* HCO2198 y el *forward* COXAF, por lo que se utilizó para todos los individuos de los ABC y el SAM.

Anexo 1.2. Programa de PCR

→ Desnaturalización, 5 min. A 95°C.

→ 35 ciclos:

○ Desnaturalización, 30s. A 95°C

○ Alineamiento, 30s. A:

	<i>Ischnochiton erythronotus</i>	<i>Ischnochiton</i> sp.
COI	57°C	55°C
16S	54°C	54°C
28S	48°C	48°C

○ Extensión, 1min. A 72°C

→ Extensión final, 1 min. A 72°C

Anexo 2. Información de los tres genes para cada grupo, *Ischnochiton* sp e *I. erythronotus*.

Tabla A2. Información estadística de los tres genes utilizados en el análisis de las poblaciones de cada uno de los grupos obtenidos. Se muestran los valores de: N- número de secuencias, n- tamaño del gen (pb), S- sitios polimórficos, h- número de haplotipos, k- número promedio de diferencias pareadas, H- Diversidad de haplotipos, Π - Diversidad nucleotídica.

	gen	N	n	S	h	k	H	Π
<i>I. erythronotus</i>	16S	93	516	27	19	6.1	0.87	0.001
	COI	54	609	32	19	12.54	0.93	0.02
	28S	75	325	1	2	0.35	0.35	0.001
<i>Ischnochiton</i> sp.	16S	32	513	4	5	0.30	0.29	0.0006
	COI	32	609	19	13	2.96	0.72	0.004
	28S	39	325	0	1	--	0.0	0.0

Anexo 3. Índices de fijación F_{ST} y G_{ST} , en los tres genes analizados en las poblaciones del clado de *I. erythronotus* (Tablas 4.1-3, Figura 4.1). Los colores resaltan los valores dentro de los sistemas arrecifales.

		SAV				ABC			SAM			
		Mo	Ga	Mr	PG	Ar	An	Al	Mu	PM	Ak	Xc
SAV	Mo	0.00	0.25	0.35	0.38	0.98	0.97	0.94	0.97	0.98	0.98	0.98
	Ga	0.30	0.00	0.02	0.20	0.98	0.97	0.94	0.97	0.98	0.98	0.98
	Mr	0.39	0.07	0.00	0.18	0.98	0.97	0.94	0.97	0.98	0.98	0.98
	PG	0.41	0.25	0.23	0.00	0.97	0.96	0.94	0.96	0.97	0.97	0.97
ABC	Ar	0.98	0.98	0.97	0.97	0.00	0.78	0.24	0.76	0.79	0.93	0.93
	An	0.96	0.97	0.97	0.96	0.80	0.00	0.36	0.63	0.66	0.88	0.87
	Al	0.94	0.95	0.95	0.94	0.34	0.44	0.00	0.41	0.46	0.76	0.76
SAM	Mu	0.97	0.97	0.97	0.97	0.72	0.60	0.43	0.00	0.39	0.87	0.86
	PM	0.97	0.97	0.97	0.97	0.82	0.69	0.53	0.27	0.00	0.90	0.90
	Ak	0.97	0.97	0.97	0.96	0.91	0.87	0.78	0.82	0.88	0.00	0.51
	Xc	0.97	0.98	0.97	0.97	0.93	0.89	0.80	0.84	0.91	0.34	0.00

Tabla 4.1. Índices de fijación para 16S en el clado de *I. erythronotus*, debajo de la diagonal se muestran los valores de G_{ST} y sobre la diagonal los valores de F_{ST} . Los colores resaltan los valores dentro de los sistemas arrecifales.

	Gallega	Morro	Alacranes	Arenas	Arcas	Puerto	Akumal	Xcalak
Gallega	-----	0.0	0.94	0.98	0.99	0.99	0.99	1.00
Morro	-0.03	-----	0.94	0.98	0.99	0.99	0.99	1.00
Alacranes	0.31	0.31	-----	0.36	0.44	0.43	0.37	0.41
Arenas	0.41	0.41	0.12	-----	0.47	0.58	0.90	0.93
Arcas	0.67	0.67	0.31	0.36	-----	0.75	0.94	0.98
Puerto	0.41	0.41	0.15	0.22	0.41	-----	0.93	0.97
Akumal	0.41	0.41	0.01	0.22	0.41	0.22	-----	0.52
Xcalak	0.82	0.82	0.41	0.51	0.82	0.51	0.43	-----

Tabla 4.2. Índices de fijación para COI en el clado de *I. erythronotus*, debajo de la diagonal se muestran los valores de G_{ST} y sobre la diagonal los valores de F_{ST} . Los colores resaltan los valores dentro de los sistemas arrecifales.

	Gallega	Morro	Perla	Arenas	Arcas	Mujeres	Akumal	Xcalak
Gallega	-----	-0.09	0.24	0.97	0.99	0.99	0.99	0.99
Morro	-0.01	-----	0.26	0.97	0.99	0.99	0.99	0.99
Perla	0.15		-----	0.96	0.98	0.97	0.98	0.98
Arenas	0.28	0.25	0.13	-----	0.73	0.60	0.88	0.87
Arcas	0.22	0.20	0.13	0.16	-----	0.87	0.97	0.97
Mujeres	0.22	0.20	0.09	0.20	0.15	-----	0.94	0.94
Akumal	0.40	0.36	0.22	0.36	0.30	0.30	-----	0.75
Xcalak	0.40	0.36	0.22	0.36	0.30	0.30	0.50	-----

Tabla 4.3. Índices de fijación para 28S en el clado de *I. erythronotus*, debajo de la diagonal se muestran los valores de G_{ST} y sobre la diagonal los valores de F_{ST} .

	Ga	Mr	PG	Al	An	Ar	Mu	PM	Ak	Xc
Ga	-----	0.00	0.00	0.98	1.00	1.00	0.96	0.96	0.96	0.98
Mr	1.00	-----	0.00	0.98	0.97	1.00	0.96	0.96	0.96	0.98
PG	1.00	1.00	-----	0.98	1.00	1.00	0.96	0.96	0.96	0.98
Al	0.78	0.78	0.78	-----	0.00	-0.09	0.03	0.03	0.03	-0.14
An	1.00	1.00	1.00	0.00	-----	0.14	0.29	0.29	0.29	0.00
Ar	0.65	0.65	0.65	-0.04	0.08	-----	0.29	-0.10	-0.10	-0.09
Mu	0.58	0.58	0.58	0.02	0.17	-0.05	-----	-0.14	-0.14	0.03
PM	0.58	0.58	0.58	0.02	0.17	-0.05	-0.07	-----	-0.14	0.03
Ak	0.58	0.58	0.58	0.02	0.17	-0.05	-0.07	-0.07	-----	0.03
Xc	0.78	0.78	0.78	-0.07	0.00	-0.04	0.02	0.02	0.02	-----

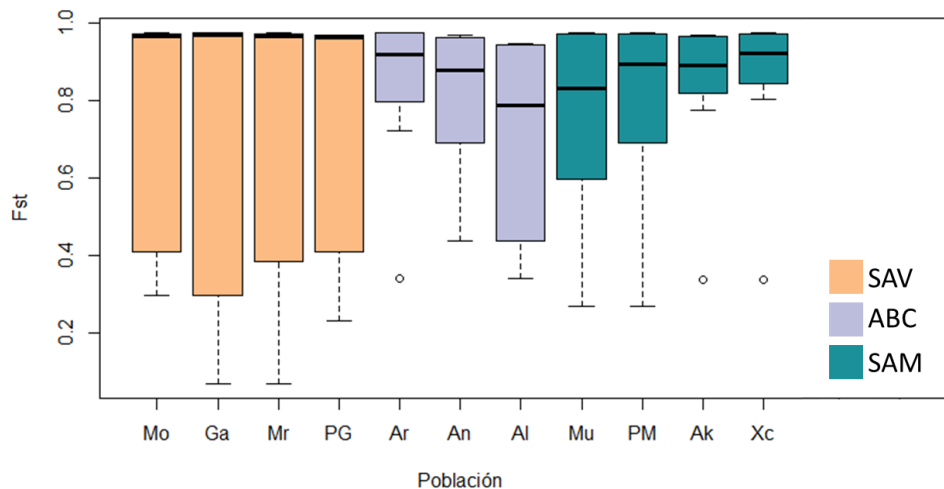


Figura 4.1. F_{ST} pareadas para las poblaciones del clado de *I. erythronotus*. Los colores indican los arrecifes a los que pertenecen las poblaciones, las líneas negras marcan la media de los valores de F_{ST} y las cajas el 50% del total de los datos.

Anexo 4. Prueba de Mantel. Aislamiento por distancia de todas las poblaciones del clado de *I. erythronotus* (Fig. 4.2).

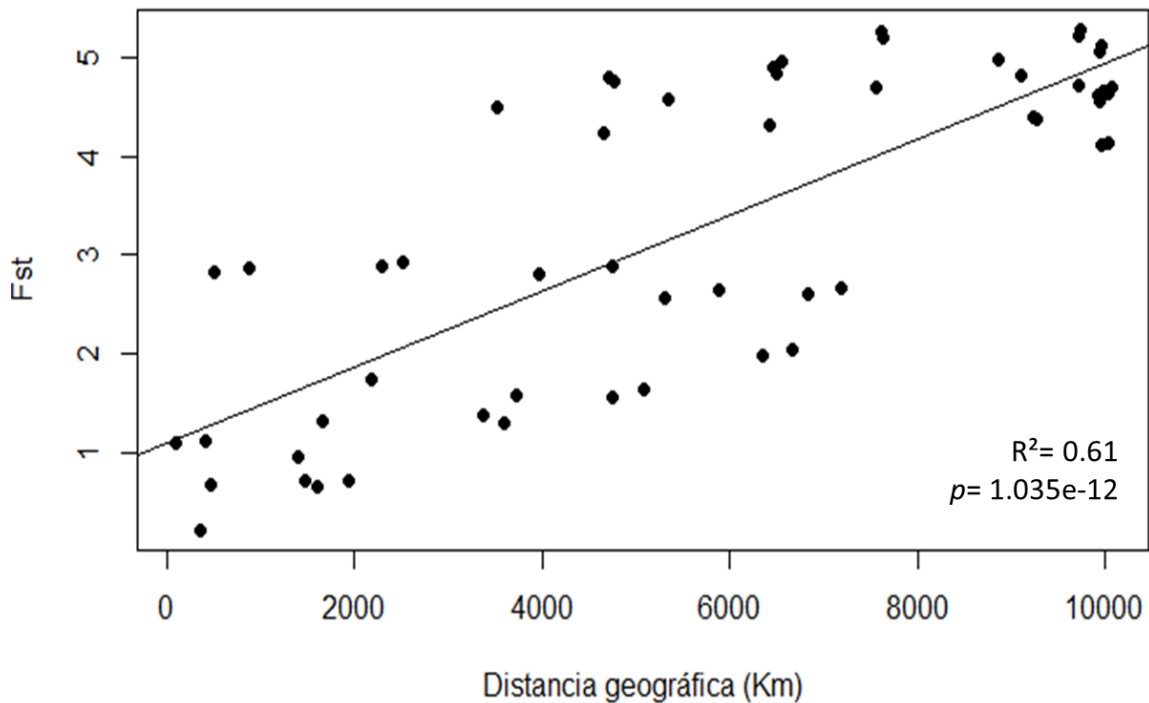


Figura 4.2. Relación pareada de la distancia genética (F_{ST}) con la distancia geográfica (km) de las poblaciones del clado de *I. erythronotus*. Se muestran los valores obtenidos para la regresión (R^2) y el valor de significancia (p).

Anexo 5. Distancias genéticas entre (Tablas 4.4-4.6) y dentro de las poblaciones del clado de *I. erythronotus* (Tabla 4.4)

Tabla 4.4. Valores de la distancia P con 16S entre las poblaciones de los tres sistemas arrecifales. Bajo la diagonal se encuentran los valores de la distancia P y sobre la diagonal los valores de error estándar.

		SAV				ABC			SAM			
		Mo	Ga	Mr	PG	Ar	An	Al	Mu	PM	Ak	Xc
SAV	Mocambo	-----	0.001	0.001	0.001	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
	Galleja	0.002	-----	0.0	0.0	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014
	Morro	0.002	0.001	-----	0.0	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014
	Perla	0.001	0.001	0.001	-----	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014
ABC	Arcas	0.125	0.124	0.125	0.125	-----	0.002	0.001	0.003	0.002	0.006	0.006
	Arenas	0.124	0.123	0.124	0.124	0.004	-----	0.002	0.003	0.002	0.006	0.006
	Alacranes	0.124	0.123	0.124	0.124	0.002	0.004	-----	0.003	0.002	0.006	0.006
SAM	Mujeres	0.127	0.126	0.127	0.127	0.006	0.006	0.006	-----	0.002	0.006	0.006
	Puerto	0.127	0.126	0.127	0.127	0.004	0.005	0.005	0.002	-----	0.006	0.006
	Akumal	0.127	0.126	0.127	0.127	0.025	0.026	0.026	0.023	0.025	-----	0.001
	Xcalak	0.127	0.126	0.127	0.127	0.023	0.024	0.024	0.021	0.023	0.002	-----

Tabla 4.5. Valores de la distancia P con COI entre las poblaciones de los tres sistemas arrecifales. Bajo la diagonal se encuentran los valores de la distancia P y sobre la diagonal los valores de error estándar.

		SAV				ABC			SAM			
--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	-----	--	--	--

		Mo	Ga	Mr	PG	Ar	An	Al	Mu	PM	Ak	Xc
SAV	Mocambo	-----	0.002	0.002	0.003	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
	Gallega	0.004	-----	0.001	0.002	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
	Morro	0.006	0.003	-----	0.002	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
	Perla	0.010	0.006	0.007	-----	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
ABC	Arcas	0.185	0.185	0.185	0.188	-----	0.005	0.002	0.004	0.004	0.007	0.007
	Arenas	0.185	0.186	0.187	0.189	0.020	-----	0.004	0.004	0.004	0.007	0.007
	Alacranes	0.185	0.186	0.186	0.189	0.007	0.015	-----	0.003	0.003	0.007	0.007
SAM	Mujeres	0.187	0.188	0.188	0.190	0.016	0.013	0.015	-----	0.001	0.006	0.006
	Puerto	0.187	0.188	0.188	0.190	0.017	0.012	0.015	0.003	-----	0.006	0.006
	Akumal	0.188	0.187	0.186	0.189	0.037	0.035	0.036	0.030	0.029	-----	0.002
	Xcalak	0.189	0.188	0.188	0.190	0.039	0.033	0.036	0.029	0.027	0.002	-----

Tabla 4.6. Valores de la distancia P con 28S entre las poblaciones de los tres sistemas arrecifales. Bajo la diagonal se encuentran los valores de la distancia P y sobre la diagonal los valores de error estándar.

		SAV				ABC			SAM			
		Mo	Ga	Mr	PG	Ar	An	Al	Mu	PM	Ak	Xc
SAV	Mocambo	-----	0.0	0.0	0.0	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
	Gallega	0.0	-----	0.0	0.0	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
	Morro	0.0	0.0	-----	0.0	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
	Perla	0.0	0.0	0.0	-----	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
ABC	Arcas	0.019	0.019	0.019	0.019	-----	0.0	0.001	0.001	0.007	0.002	0.001
	Arenas	0.019	0.019	0.018	0.018	0.000	-----	0.001	0.001	0.001	0.002	0.0
	Alacranes	0.020	0.020	0.019	0.019	0.001	0.001	-----	0.001	0.001	0.001	0.001
SAM	Mujeres	0.020	0.020	0.019	0.020	0.001	0.001	0.001	-----	0.001	0.001	0.001
	Puerto	0.019	0.019	0.019	0.019	0.001	0.001	0.001	0.001	-----	0.001	0.001
	Akumal	0.020	0.020	0.020	0.020	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	-----	0.001
	Xcalak	0.019	0.019	0.019	0.019	0.001	0.00	0.001	0.001	0.001	0.001	-----

Tabla 4.7. Valores de la distancia P dentro de las poblaciones para cada uno de los tres genes y con los tres genes concatenados. Al lado derecho de cada columna con la distancia P se encuentran los valores de error estándar correspondiente.

		28S	SE	16S	SE	COI	SE	Conca	SE
SAV	Mocambo	0.00	0.0	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.001
	Gallega	0.00	0.0	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.001
	Morro	0.00	0.0	0.001	0.001	0.004	0.001	0.002	0.001
	Perla	0.00	0.0	0.001	0.001	0.006	0.002	0.003	0.001
ABC	Arcas	0.001	0.001	0.0	0.0	0.002	0.001	0.001	0.001
	Arenas	0.00	0.0	0.001	0.001	0.003	0.002	0.002	0.001
	Alacranes	0.002	0.002	0.004	0.002	0.13	0.004	0.007	0.002
SAM	Mujeres	0.002	0.002	0.0	0.0	0.003	0.001	0.002	0.001
	Puerto	0.002	0.001	0.0	0.0	0.002	0.001	0.001	0.001
	Akumal	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001	0.0	0.001	0.001
	Xcalak	0.001	0.001	0.0	0.0	0.001	0.001	0.001	0.0

Anexo 6. Distancia genética dentro y entre grupos genéticos del clado de *I. erythronotus* y otras especies de polioplacóforos (Tabla 4.8-4.10).

Tabla 4.8. Comparación la distancia genética que existe entre los grupos genéticos del clado de *I. erythronotus* y otras especies de poliplacóforos, utilizando 16S. Debajo de la diagonal se encuentran los valores de la distancia P y sobre la diagonal los valores de error estándar para cada uno.

	<i>Ischnochiton</i> sp.	<i>I. erythronotus</i>	<i>I. boninensis</i>	<i>I. comptus</i>	<i>A. crinita</i>	<i>M. plumosa</i>
<i>Ischnochiton</i> sp.	-----	0.014	0.017	0.017	0.018	0.018
<i>I. erythronotus</i>	0.132	-----	0.017	0.017	0.018	0.017
<i>I. boninensis</i>	0.205	0.188	-----	0.010	0.017	0.017
<i>I. comptus</i>	0.205	0.194	0.062	-----	0.017	0.016
<i>A. crinita</i>	0.246	0.223	0.213	0.202	-----	0.016
<i>M. plumosa</i>	0.228	0.206	0.0183	0.181	0.176	-----
Dentro de las especies	0.0	0.012	0.0	0.002	0.0	0.007
SE	0.001	0.003	0.001	0.001	0.0	0.002

Tabla 4.9. Comparación la distancia genética que existe entre los grupos genéticos del clado de *I. erythronotus* y otras especies de poliplacóforos, utilizando COI. Debajo de la diagonal se encuentran los valores de la distancia P y sobre la diagonal los valores de error estándar para cada uno.

	<i>Ischnochiton</i> sp.	<i>I. erythronotus</i>	<i>I. australis</i>	<i>I. boninensis</i>	<i>C. apiculata</i>	<i>S. purpurascens</i>
<i>Ischnochiton</i> sp.	-----	0.016	0.015	0.016	0.015	0.015
<i>I. erythronotus</i>	0.190	-----	0.016	0.016	0.015	0.016
<i>I. australis</i>	0.197	0.212	-----	0.015	0.015	0.015
<i>I. boninensis</i>	0.199	0.204	0.163	-----	0.016	0.015
<i>C. apiculata</i>	0.184	0.193	0.188	0.197	-----	0.015
<i>S. purpurascens</i>	0.196	0.206	0.182	0.176	0.203	-----
Dentro de las especies	0.005	0.025	0.005	0.002	0.0	0.045
SE	0.002	0.005	0.002	0.001	0.0	0.007

Tabla 4.10. Comparación la distancia genética que existe entre los grupos genéticos del clado de *I. erythronotus* y otras especies de poliplacóforos, utilizando 28S. Debajo de la diagonal se encuentran los valores de la distancia P y sobre la diagonal los valores de error estándar para cada uno.

	<i>Ischnochiton</i> sp.	<i>I. erythronotus</i>	<i>I. comptus</i>	<i>I. boninensis</i>	<i>M. plumosa</i>
<i>Ischnochiton</i> sp.	-----	0.007	0.018	0.017	0.017
<i>I. erythronotus</i>	0.017	-----	0.017	0.017	0.017
<i>I. comptus</i>	0.10	0.101	-----	0.007	0.017
<i>I. boninensis</i>	0.097	0.101	0.019	-----	0.017
<i>M. plumosa</i>	0.099	0.104	0.105	0.106	-----
Dentro de las especies	0.002	0.0	0.002	0.001	0.005
SE	0.002	0.0	0.002	0.001	0.002

ANEXOS

Capítulo 2

Anexo 7. Prueba de Homogeneidad de pendientes para la prueba de alometría (Tabla 4.11)

Tabla 4.11. Resultados de la tabla de prueba de pendiente para la prueba de alometría de las diferentes vistas, mediante ANCOVA. Resaltados con gris se muestran los resultados significativos

Entre	Entre especies
-------	----------------

arrecifes						
	R2	F	p	R2	F	p
Cuerpo completo	0.02	1.39	0.02	0.01	1.74	0.02
PAP	0.04	2.39	0.008	0.04	4.76	0.004
Valva V	0.02	0.35	0.91	0.01	0.6	0.58

Anexo 8. Análisis de la forma de las valvas cefálica y anal en el clado de *I. erythronotus*.

Tabla 4.12. Valores de la prueba de Tukey para los ángulos de la valva cefálica y valva anal, con poblaciones pareadas, se muestra el Sistema arrecifal al que pertenecen y el valor de P, solo se incluyen los casos que resultaron significativos.

Poblaciones Pareadas	Sistema Arrecifal	p adj
	Valva anal	
Ar-Ak	SAM-SAM	0.0001088
Ga-Ak	SAV-SAM	0.0059554
Mr-Ak	SAV-SAM	0.0000001
PG-Ak	SAV-SAM	0.0000520
PM-Ak	SAM-SAM	0.0130009
Mr-AI	SAV-ABC	0.0007209
Mr-An	SAV-ABC	0.0009294
Mu-Mr	SAM-SAV	0.0004990
PM-Mr	SAM-SAV	0.0138552
Xc-Mr	SAM-SAV	0.0013124
PG-Mu	SAV-SAM	0.0562641
	Valva cefálica	
Xc-AI	SAM-ABC	0.0283103