

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / RESEARCH ARTICLE

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DEL ANFÍPODO TERRESTRE *Talitroides topitotum* (Crustacea:Amphipoda:Talitridae) EN COSTA RICA

Molecular Identification and Potential Distribution of Terrestrial Amphipod *Talitroides topitotum* (Crustacea:Amphipoda:Talitridae) in Costa Rica

Rodolfo UMAÑA-CASTRO¹, José Antonio CAMBRONERO-GRANADOS¹, José Pablo CARVAJAL-SÁNCHEZ^{2,3}, Jorge ALFARO-MONTOYA⁴.

¹ Laboratorio de Análisis Genómico, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

² Instituto de Conservación y Manejo de Vida Silvestre, Universidad Técnica Nacional, Sede Atenas Apdo. Balsa de Atenas, Costa Rica.

³ Instituto de Conservación y Manejo de Vida Silvestre, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

⁴ Estación de Biología Marina Lic. Juan Bertoglia Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, UNA. Puntarenas, Costa Rica.

For correspondence. rodolfo.umana.castro@una.cr

Received: 6th June 2017, **Returned for revision:** 14th October 2017, **Accepted:** 21st October 2017.

Associate Editor: Francisco José Martínez Pérez.

Citation/Citar este artículo como: Umaña-Castro R, Cambronero-Granados JA, Carvajal-Sánchez JP, Alfaro-Montoya J. Identificación molecular y distribución potencial del anfípodo terrestre *Talitroides topitotum* (Crustacea:Amphipoda:Talitridae) en Costa Rica. Acta biol. Colomb. 2018;23(1):104-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n1.65335>

RESUMEN

El anfípodo terrestre, *Talitroides topitotum*, es un talitrido distribuido mundialmente en regiones subtropicales y templadas, con un amplio rango de distribución altitudinal, temperatura y humedad. Se colectaron y procesaron especímenes desde el año 2012 al 2016, mediante remoción-filtración de sustratos húmedos. Se identificaron taxonómicamente por características fenotípicas diagnósticas, se determinó su estado de desarrollo y se separaron por sexo. Se extrajo ADN de anfípodos completos, seguido de una PCR de los genes citocromo oxidasa subunidad 1 y del ARN ribosomal de la subunidad 16S. Se obtuvo un árbol filogenético por máxima verosimilitud con un modelo GTR-GAMMA. El análisis de la distribución potencial de *T. topitotum* se estimó utilizando 19 variables bioclimáticas. En este estudio, se amplía la distribución previamente reportada y en altitudes entre los 1900 a 595 m s.n.m. Se analizaron 39 localidades, en las cuales: 1) Hay presencia de *T. topitotum*, 2) no hubo presencia de anfípodos terrestres, 3) no hubo presencia de *Talitroides* sp., pero sí de un anfípodo nativo. La abundancia proporcional de *T. topitotum* se inclina hacia las hembras adultas, una proporción alta de juveniles y no se detectaron individuos machos. El análisis bioinformático determinó el posicionamiento taxonómico de la especie *T. topitotum* dentro del agrupamiento de anfípodos terrestres, además, la especie exógena diverge de *Cerrorchestia hyloraina* demostrando una separación filogenética entre especies, las cuales pueden estar compartiendo hábitats. *T. topitotum*, según el modelo de máxima entropía, posee una alta capacidad de dispersión y estaría siendo favorecida, en cuanto a su asentamiento y propagación, por elementos climáticos como temperatura, precipitación y humedad, y factores como la altitud. Nuestros hallazgos son relevantes para la toma de decisiones de manejo y monitoreo del desplazamiento de especies nativas de anfípodos terrestres en la región.

Palabras clave: ADNmt, mueve-tierra, peracáridos, anfípodos introducidos, talitridos.

ABSTRACT

The land-hopper, *Talitroides topitotum*, is a talitrid amphipod distributed worldwide in subtropical and template regions, with a wide range of altitudinal distribution, temperature and humidity. Specimens were collected and processed since 2012 until 2016, by collection-filtration of wet substrates. Specimens were taxonomically identified using diagnostic phenotypic characteristics, and the developmental stage and sex were recorded. DNA was extracted from whole amphipods, followed by PCR of cytochrome oxidase subunit 1 and ribosomal RNA subunit 16S genes. Partial genetic sequences were obtained and a maximum-likelihood phylogenetic

tree was calculated based on a GTR-GAMMA model. The analysis of potential distribution of *T. topitotum* was estimated using 19 bioclimatic variables. This study extends the previously reported distribution and elevations between 1900 and 595 m a.s.l. Thirty-nine localities were analyzed, where the following categories were registered: 1) *T. topitotum* is present, 2) terrestrial amphipods are not present, 3) *T. topitotum* is not present, but the native amphipod is present. The relative abundance of *T. topitotum* corresponds to adult females, a high proportion of juveniles and no males were collected. The bioinformatic analysis established the taxonomic position of *T. topitotum* within a group of terrestrial amphipods; moreover, the invasive species diverges of *Cerrodontostella hyloraina*, demonstrating the phylogenetic separation between these species that could be sharing habitats. Based on the model of maximum entropy, *T. topitotum* shows a high dispersion capacity and its establishment and propagation are been improved by climatic elements such as temperature, precipitation, humidity, and elevation. Our findings are relevant for management policies and monitoring the distribution of native species of terrestrial amphipods in the region.

Keywords: mtDNA, land-hopper, peracarids, introduced amphipod, talitrids.

INTRODUCCIÓN

El anfípodo cosmopolita *Talitroides topitotum* (Burt, 1934; Familia Talitridae) es un talitrido estrictamente terrestre (*land-hopper*), ampliamente distribuido en el mundo, principalmente en el estrato superficial boscoso de regiones subtropicales y templadas. Su rango de distribución altitudinal va desde el nivel del mar hasta los 2475 m s.n.m. Esta especie habita en zonas con temperaturas desde los 13 a 30 °C, humedad relativa desde 52 % y abundantes precipitaciones (al menos 100 mm al mes) (Alvarez *et al.*, 2000; Matavelli *et al.*, 2009; Alfaro-Montoya y Umaña-Castro, 2013; Morino, 2013). El rango nativo de esta especie no está claro, sin embargo, fue reportado por primera vez en Sri Lanka y la India en 1934, lo que indica que su posible centro de origen sea la región del Indo-Pacífico (Friend y Richardson, 1986). Recientemente, se reportó la ocurrencia de *T. topitotum* en la isla de Yava, Indonesia (Daneliya y Wowor, 2016), y en el bosque lluvioso Atlántico, sureste de Brasil (Nascimento y Serejo, 2016).

En la región, el primer reporte de *Talitroides topitotum* se dio en 1992, en la Ciudad de México (19°32' 20" N, 90° 11'39" W), y se presume que su introducción coincide con la entrada a la zona de una gran cantidad de plantas exóticas (Alvarez *et al.*, 2000). La primera descripción taxonómica de talitridos terrestres para Costa Rica, fue llevada a cabo por Lindeman (1990), en la cual se describe a la especie nativa *Cerrodontostella hyloraina*, ubicada en zonas de amortiguamiento y zonas protegidas en el área de Monteverde, Provincia de Puntarenas, a mitad de la década de los 80's; para este período no se reportó la presencia de *T. topitotum*. El primer registro de este anfípodo exótico en Costa Rica fue realizado en el 2012 por Alfaro-Montoya y Umaña-Castro (2013), los cuales indican que esta especie posee una ocurrencia en las zonas montañosas de los cantones de San Rafael y Barva de Heredia, observándose una predominancia de juveniles y hembras. Sin embargo, este estudio se enfocó únicamente en la región norte de la provincia y en la taxonomía basada en características fenotípicas diagnósticas.

De acuerdo a Friend y Richardson (1986) y Lindeman (1990), el anfípodo *T. topitotum* se considera como una especie sinantrópica, debido a que se ha reportado su introducción en regiones como Norteamérica (Biernbaum,

1980), México (Álvarez *et al.*, 2000), Brasil (Eutrópico y Krohling, 2013) y en invernaderos ubicados en Europa (Vader, 1972). Se desconoce cómo *T. topitotum* pudo haber sido introducida en Costa Rica, sin embargo, según menciona Matavelli *et al.* (2009) y Daneliya y Wowor (2016), la actividad que ha favorecido mayormente su dispersión es la silvicultura, tal como lo ha sido la importación de plantas de *Eucalyptus* sp. desde Estados Unidos hacia Brasil (Matavelli y Uehara-Prado, 2014), la sustitución de árboles nativos de *Acacia okoa* por especies exóticas como *Metrosideros collina* y la introducción de arbustos del género *Eucalyptus* sp., *Melaleuca* sp. y *Grevillea* sp., en la isla de O'ahu, Hawaii (Richardson, 1992). La capacidad de dispersión de esta especie se debe a una característica ancestral de proporción sesgada de sexos de *T. topitotum*, la cual varía hasta en cuatro hembras por cada un macho, que le facilita convertirse en una plaga si este no encuentra depredadores naturales (Alvarez *et al.*, 2000). Lima *et al.* (2014) concluyen que, mediante un modelo compartimental de la dinámica de poblaciones de *T. topitotum* en el bosque Atlántico brasileño, la estrategia adoptada por esta especie para reproducirse es utilizando picos de reclutamiento en estaciones climáticas favorables a temperaturas entre 11.5 y 23.5 °C, con un óptimo de 20 °C, colaborando con la prevalencia y abundancia de este anfípodo cosmopolita. Por otra parte, se le ha atribuido la capacidad de desplazar especies nativas cuando logra establecerse en nuevas áreas de colonización (Howart, 1985; Richardson, 1992), no obstante, aún no es claro si su presencia puede generar algún impacto biológico negativo sobre las comunidades nativas.

Actualmente, en las bases mundiales de datos génicos, existe limitada información del género *Talitroides* sp. (dos especies: *topitotum* y *alluaudi*), para los genes mitocondriales citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y del gen del ARN ribosomal subunidad 16S. Estas secuencias genéticas son empleadas para deducir relaciones filogenéticas e identificación taxonómica en diferentes niveles jerárquicos dentro de crustáceos peracáridos, ofreciendo un amplio margen de información evolutiva (Davolos y Maclean, 2005; Weiss *et al.*, 2014), para obtener evaluaciones locales de biodiversidad mediante herramientas moleculares convencionales.

La presente investigación expone datos moleculares de genes informativos mitocondriales, con el fin de determinar la identidad taxonómica del anfípodo cosmopolita monitoreado desde los 2130 m s.n.m. hasta los 180 m s.n.m. alrededor del país. Por otro lado, nos enfocamos en ampliar la distribución previamente reportada, junto con la abundancia absoluta de este anfípodo terrestre introducido en Costa Rica, con lo que obtuvimos la distribución potencial de expansión de la especie exótica *T. topitotum* a nivel nacional. Lo anterior, con la finalidad de discutir acerca de los posibles impactos que podría generar la introducción y propagación de una especie exótica en un hábitat que alberga a una especie nativa de anfípodo terrestre, tal como *Cerrochestia hyloraina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y procesamiento de los especímenes

Los especímenes de *T. topitotum* se colectaron durante los años 2012-2016 (Tabla 1), específicamente en zonas húmedas (humedad relativa entre 90-100 %) y templadas (temperaturas entre los 12 y 25 °C), entre elevaciones que van desde los 180 m s.n.m. hasta los 2130 m s.n.m. Los individuos se colectaron y procesaron mediante el método de remoción-filtración de sustratos húmedos (Alfaro-Montoya y Umaña-Castro, 2013). Los ejemplares obtenidos se transportaron y preservaron en etanol 70-96 % respectivamente, se examinaron en un estereomicroscopio OLYMPUS SZ61TR y se fotografiaron con una cámara digital SC30 (OLYMPUS). Los individuos se identificaron taxonómicamente hasta el nivel más bajo según indica Alfaro-Montoya y Umaña-Castro (2013). Los mismos se contabilizaron y se determinó su estado de desarrollo en juveniles (< 7 mm longitud total) (Alfaro-Montoya y Umaña-Castro, 2013) y adultos, además, se separaron por sexo (las hembras adultas poseen la presencia de oostegitos) para determinar su respectiva abundancia absoluta y porcentual (considerándose el número de hembras adultas, machos adultos y juveniles entre el número total de la muestra por localidad). Por otro lado, se colectaron individuos de *Cerrochestia hyloraina* como una especie control de anfípodo terrestre para fines comparativos. Los especímenes se depositaron en el Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica con los siguientes números de accesión: *T. topitotum*, MZUCR 3468-3471; *C. hyloraina*, MZUCR 3472-3476. La cartografía de los sitios de muestreo para *T. topitotum* se elaboró mediante el programa Quantum Gis versión 2.14.3 (<http://www.qgis.org/es/site/>), bajo la proyección de coordenadas CRTM05.

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El procedimiento de extracción de ADN total se realizó con el kit PureLink® Genomic DNA extraction (Thermo

Scientific™) según instrucciones de manufactura y utilizando seis anfípodos completos para cada extracción. La PCR se optimizó para amplificar regiones mitocondriales informativas de los genes citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) con un tamaño esperado de 710 pb y el gen del ARN ribosomal de la subunidad 16S con 550 pb, empleando los cebadores LCO1490 5`-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3` y HCO2198 5`-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3` para COI (Folmer *et al.*, 1994) y 16S L2 5`-TGCCTGTTTATCAAAAACAT-3` (Schubart *et al.*, 2002) y 16S1472 5`-AGATAGAAACCAACCTGG-3` (Crandall y Fitzpatrick, 1996) para el gen 16S. Una reacción PCR estándar de 25 µL se ejecutó mediante la siguiente receta: 4 µl 5X Buffer Taq; 1,6 µl MgCl₂ (25 mM); 0,2 µl dNTPs (10 mM); 0,4 µl (10 µM) de cada cebador en sentido directo e inverso; 0,125 µl Go Taq ADN polimerasa 5 U/µl (Promega); 1 µl ADN molde (diluido en una décima parte para evitar inhibición de la reacción) y finalmente, se completó el volumen con agua libre de nucleasas (Ambion). La reacción enzimática fue conducida en un termociclador automático (Proflex PCR System; Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Los parámetros de termociclado consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 36 ciclos de 95 °C, 45 s; 49-56 °C, 1 min; 72 °C, 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Secuenciación y análisis bioinformático

Los fragmentos parciales amplificados de los genes COI y 16S fueron marcados en dos direcciones mediante el kit BigDye Terminator® V3.1 (Applied Biosystems), según las instrucciones de manufactura. Los productos resultantes se purificaron con el kit Xterminator® (Applied Biosystems) y seguidamente, fueron movilizados en un analizador genético modelo ABI 3130 (Applied Biosystems) en el Laboratorio de Análisis Genómico, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional. Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando Geneious® versión R8 (Biomatters Ltda) y analizadas con el algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), contra la colección de nucleótidos de la base de datos (nr/nt) para determinar su identidad nucleotídica. Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank. Las secuencias parciales obtenidas se alinearon, junto con secuencias de individuos de la familia Talitridae obtenidas del Genbank, utilizando el programa en línea MAFFT 7.0 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>), con el método iterativo de refinamiento (FFT-NS-i) y con el parámetro 1PAM / k = 2. Para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica, el alineamiento se analizó con jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) con la estrategia de selección mediante el criterio de información de Akaike (AIC). Basado en lo anterior, se realizó un árbol de posicionamiento filogenético utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud (ML) mediante el

programa raxmlGUI v.7.4.2 (Stamatakis *et al.*, 2005) con el modelo reversible en tiempo general (GTR-GAMMA), empleando 2000 inferencias de *bootstrap*. Los árboles fueron visualizados y editados con el programa FigTree 1.4 (Rambaut, 2009).

Modelo de distribución potencial

El análisis de distribución potencial del anfípodo terrestre *T. topitotum* se realizó mediante el software MaxEnt (*Maximum entropy approach to modelling species's distributions*) versión 1.4 (Phillips *et al.*, 2017), utilizando la base de datos Worldclim 2 (Fick y Hijmans, 2017), a partir de la cual se implementaron diferentes variables bioclimáticas que abarcan temperaturas medias y precipitaciones. El modelo MaxEnt estima las distribuciones de probabilidad de máxima entropía (distribución más uniforme) sujeto a restricciones dadas por la información ambiental, por ejemplo con el uso de capas bioclimáticas en su elaboración como variables para la predicción de futuros hábitats (uso de datos de presencia creando puntos de pseudoausencias). El modelo clasifica píxeles con un valor continuo de probabilidad de ocurrencia entre 0,0 y 1,0; donde el valor de 0 significa ausencia de la especie y un valor de 1 un 100 % de probabilidad de encontrar la especie.

Variables bioclimáticas

Se utilizaron 19 variables bioclimáticas obtenidas de la base de datos Worldclim 2 (<http://www.worldclim.org> consultado marzo 2017), que contiene las estimaciones globales de la temperatura media, máxima a mínima y de la precipitación a 1.0 km de resolución entre los años 2000-2015. Las variables bioclimáticas son mensuales y se derivan de los valores medios de temperatura (en grados centígrados) y de las precipitaciones (milímetros) (Mazzolari, 2011) (Tabla Suplementaria 1).

RESULTADOS

Las colectas y observaciones se realizaron desde la Cordillera de Guanacaste (noroeste) hasta la cordillera de Talamanca (sur, SGD), Costa Rica, indicando una distribución norte-sur de *T. topitotum*, principalmente en localidades donde se observan alteraciones o un impacto producido por el ser humano (Fig. 1). Por otro lado, la presencia de anfípodos terrestres está asociada a zonas húmedas y con alta cobertura boscosa (Fig. 2), entre altitudes de los 1900 a 595 m s.n.m. según nuestras observaciones pero ausentes a elevaciones entre 1920- 2130 m s.n.m. y entre los 500-180 m s.n.m.

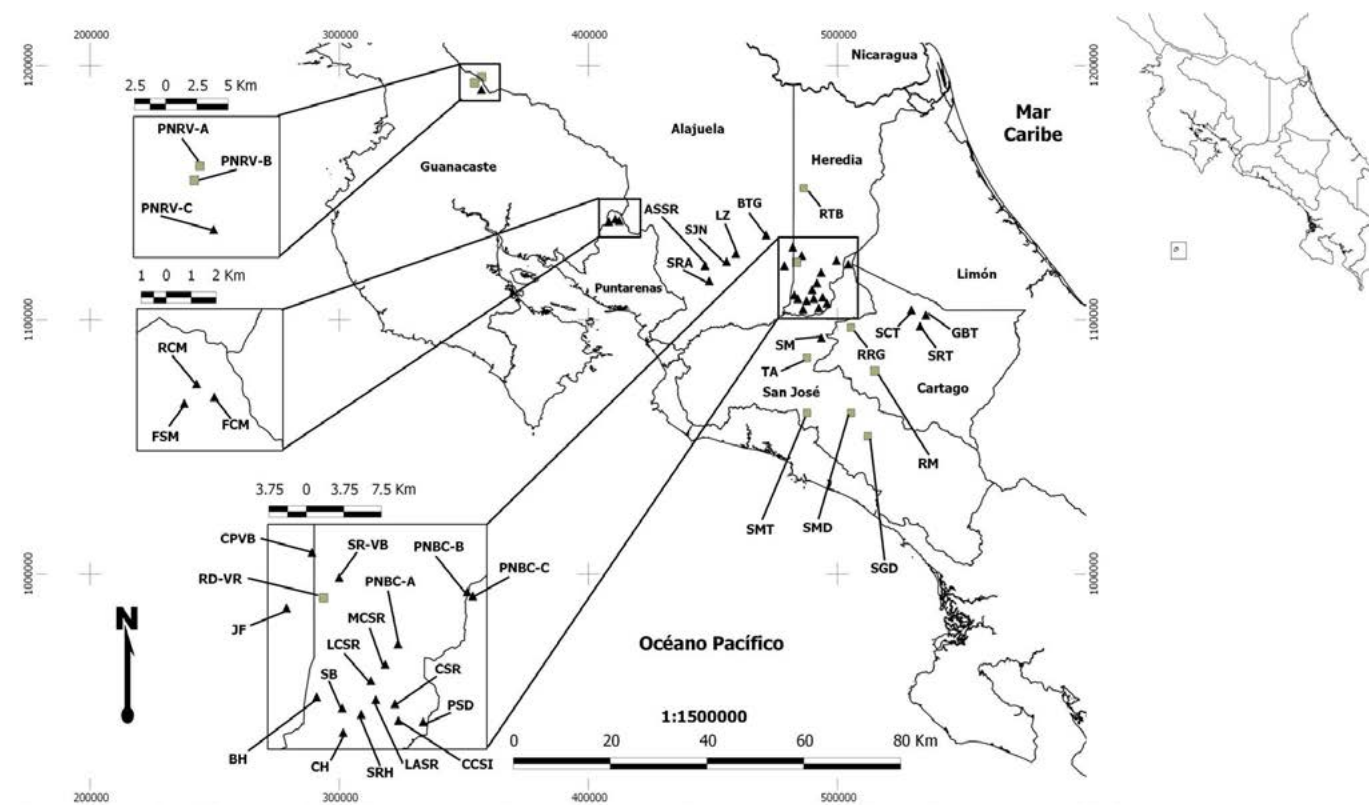


Figura 1. Reporte de distribución de los sitios de muestreo realizados en Costa Rica para el monitoreo del anfípodo terrestre *Talitroides topitotum*. Las figuras geométricas indicadas como triángulos oscuros (▲): presencia de *T. topitotum* y cuadros grises (■): ausencia de *T. topitotum*. El significado del código del mapa se revela en la tabla 1.

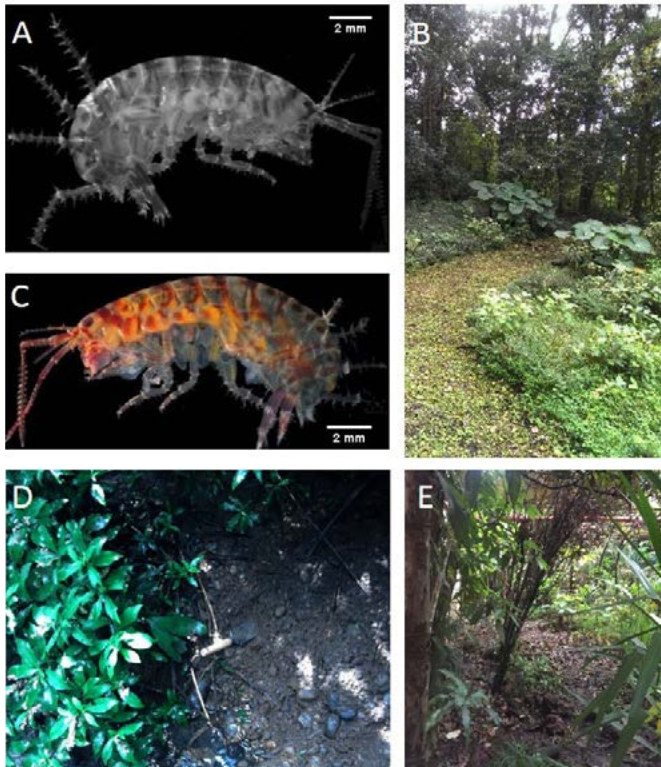


Figura 2. Especímenes frescos del anfípodo terrestre *Talitroides topitotum* (longitud total máxima de 12 mm) y hábitat de donde fue colectado. A, B y E) *T. topitotum* colectado en Monteverde (ver: <https://youtu.be/YXyl4jCcyGg> y video suplementario 1, cedido por James Wolfe), Curicancha (1400 msnm), Puntarenas. C y D) *T. topitotum* colectado en la zona del Zurquí, en el margen del río Sanguijuela (750 msnm), Bajo de la Hondura, Heredia.

Se analizaron 914 individuos del anfípodo terrestre *T. topitotum* en 39 localidades dentro del territorio costarricense, de las cuales, en diez localidades se presentó el siguiente escenario: no hubo presencia de anfípodos terrestres o no hubo presencia de *T. topitotum*, pero sí de otro anfípodo terrestre del género *Cerrodontia hyloraina*. La abundancia proporcional de *T. topitotum* se observa incrementada hacia las hembras y una proporción alta de individuos juveniles; dentro de las poblaciones exploradas, no se detectaron individuos machos (Tabla 1).

La secuenciación de regiones parciales de los genes citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) (número de acceso a la base de datos genéticos GenBank: MF177096-MF177098) y el gen 16S ARN ribosomal (16S) (accesiones número MF072683-MF072685), seguidamente de un análisis bioinformático de alineamiento múltiple y máxima verosimilitud, determinó el posicionamiento taxonómico de la especie *T. topitotum* dentro del agrupamiento de géneros de anfípodos terrestres. Por ejemplo, los individuos colectados en la zona de Monteverde y San Rafael de Heredia, y posicionados dentro de un árbol taxonómico que incluye a diferentes géneros de anfípodos terrestres y semi-terrestres, se agrupan en el clado de la especie introducida *T. topitotum* en la topología de citocromo oxidasa subunidad 1 (Fig. 3A) y se asocian entre sí formando un clado en la topología derivada del gen de la subunidad ribosomal 16S (Fig. 3B). Por otro lado, nuestras secuencias locales del anfípodo *T. topitotum* divergen evolutivamente de la especie nativa *C. hyloraina*, demostrando una separación filogenética entre

Tabla 1. Ubicación y estimación de la abundancia proporcional sexual de *T. topitotum* colectados durante el período 2012-2016 en Costa Rica.

Sitio de colecta	Localidad en mapa*	Período	Latitud/Longitud	m s.n.m	N	Abundancia proporcional (%)			
						Hembras	Machos	Juveniles	N.S.
San Gerardo Dota	SGD	2014	9°32'3"N/ 83°53'21"O	2130	0	-	-	-	-
Río Desengaño Vara Blanca	RD-VR	2016	10°9'10"N/84°9'0"O	2045	0	-	-	-	-
Parque Nacional Rincón de la Vieja Volcán Santa María	PNRV-A	2015	10°48'32"N/ 85°19'12"O	1920	0	-	-	-	-
Parque Nacional Braulio Carrillo Sector Volcán Barva	PNBC-A	2013	10°5'24"N/ 84°3'36"O	1900	5	100	0	0	0
Monte de la Cruz San Rafael	MCSR	2012	10°4'22"N/ 84°4'31"O	1862	9	33,3	0	66,7	0
Santa María Dota	SMD	2015	9°37'2"N/ 83°57'2"O	1850	0	-	-	-	-
San Rafael Vara Blanca	SR-VB	2015	10°10'2"N/ 84°8'55"O	1845	7	57,1	0	42,9	0
Jaulares Fraijanes	JF	2015	10°8'28"N/84°11'41"O	1780	14	50	0	50	0
Tarabaca Aserrí	TA	2013	9°48'48"N/ 84°6'43"O	1760	0	-	-	-	-
La Legua Zarcero	LZ	2013	10°10'59"N/84°23'59"O	1736	63	44,4	0	44,4	11,1
Las Chorreras San Rafael	LCSR	2012	10°3'21"N/84°5'34"O	1650	5	80	0	0	20

Sitio de colecta	Localidad en mapa*	Período	Latitud/Longitud	m s.n.m	N	Abundancia proporcional (%)			
						Hembras	Machos	Juveniles	N.S.
San José Naranjo	SJN	2013	10°9'20"N/84°24'23"O	1650	14	92,9	0	7,1	0
Parque Nacional Rincón de la Vieja Sector Santa María	PNRV-B	2013	10°48'5"N/85°19'7"O	1630	0	-	-	-	-
Estación Río Macho (UNA) Orosí	RM	2013	9°45'58"N/83°51'48"O	1621	0	-	-	-	-
San Marcos Tarrazú	SMT	2013	9°37'1"N/84°6'41"O	1620	0	-	-	-	-
Los Ángeles San Rafael	LASR	2012	10°2'17"N/84°5'12"O	1496	42	71,4	0	26,2	2,4
Concepción San Rafael	CSR	2012	10°1'44"N/84°4'5"O	1490	61	70,5	0	29,5	0
Finca Campbell Monteverde	FCM	2016	10°18'0"N/84°48'0"O	1450	3	100	0	0	0
Reserva Curicancha Monteverde	RCM	2016	10°18'22"N/ 84°48'28"O	1430	11	81,8	0	18,2	0
Catarata de La Paz Vara Blanca	CPVB	2015	10°12'23"N/84° 9'50"O	1424	14	85,7	0	14,3	0
Calle Chaves San Isidro	CCSI	2013	10°1'21"N/84°3'12"O	1390	16	81,3	0	6,2	12,5
Paracito Santo Domingo	PSD	2013	10°0'28"N/84°1'31"O	1369	7	85,7	0	0	14,3
Santa Cruz Turrialba	SCT	2013	9°59'0"N/83°43'47"O	1360	29	100	0	0	0
Finca Stuckey Monteverde	FSM	2013	10°17'49"N/84°48'39"O	1350	50	32	0	68	0
San Rafael Heredia	SR	2013	10°0'59"N/84°5'59"O	1264	423	33,6	0	63,1	3,3
Bajos del Toro Amarillo Grecia	BTG	2015	10°14'59"N/84°15'42"O	1251	20	80	0	20	0
Rancho Redondo Goicoechea	RRG	2013	9°57'41"N/83°57'3"O	1250	0	-	-	-	-
Barva Heredia	BH	2013	10°1'26"N/84°7'6"O	1225	6	50	0	50	0
San Miguel Desamparados	SM	2014	9°53'4"N/84°3'33"O	1212	5	40	0	60	0
Santa Bárbara Heredia	SB	2013	10°2'12"N/84°9'30"O	1193	7	71,4	0	14,3	14,3
Ángeles Sur San Ramón	ASSR	2012	10°8'27"N/84°29'7"O	1175	10	80	0	20	0
Cubujuquí Heredia	CH	2013	9°59'58"N/84°7'34"O	1125	8	75	0	25	0
San Ramón Alajuela	SRA	2013	10°5'13"N/84°28'12"O	1057	20	45	0	45	10
Guayabo abajo Turrialba	GBT	2013	9°57'55"N/83°40'36"O	972	8	62,5	0	37,5	0
Santa Rosa Turrialba	SRT	2012	9°55'34"N/83°41'52"O	822	9	88,9	0	11,1	0
Parque Nacional Rincón de la Vieja Sendero Colibrí	PNRV-C	2015	10°45'50"N/85°18'25"O	800	6	66,7	0	33,3	0
Parque Nacional Braulio Carrillo Quebrada Sanguijuela	PNBC-B	2013	10°9'36"N/83°57'47"O	750	37	54,1	0	43,2	2,7
Parque Nacional Braulio Carrillo Quebrada González	PNBC-C	2014	10°9'35"N/83°58'27"O	595	5	40	0	40	20
Reserva Biológica La Tirimbina Sarapiquí	RBT	2015	10°24'59"N/84°7'28"O	180	0	-	-	-	-

N.S: No sexado por deterioro.

m. s.n.m: metros sobre el nivel del mar

n: número de individuos colectados

*Ver Figura 1

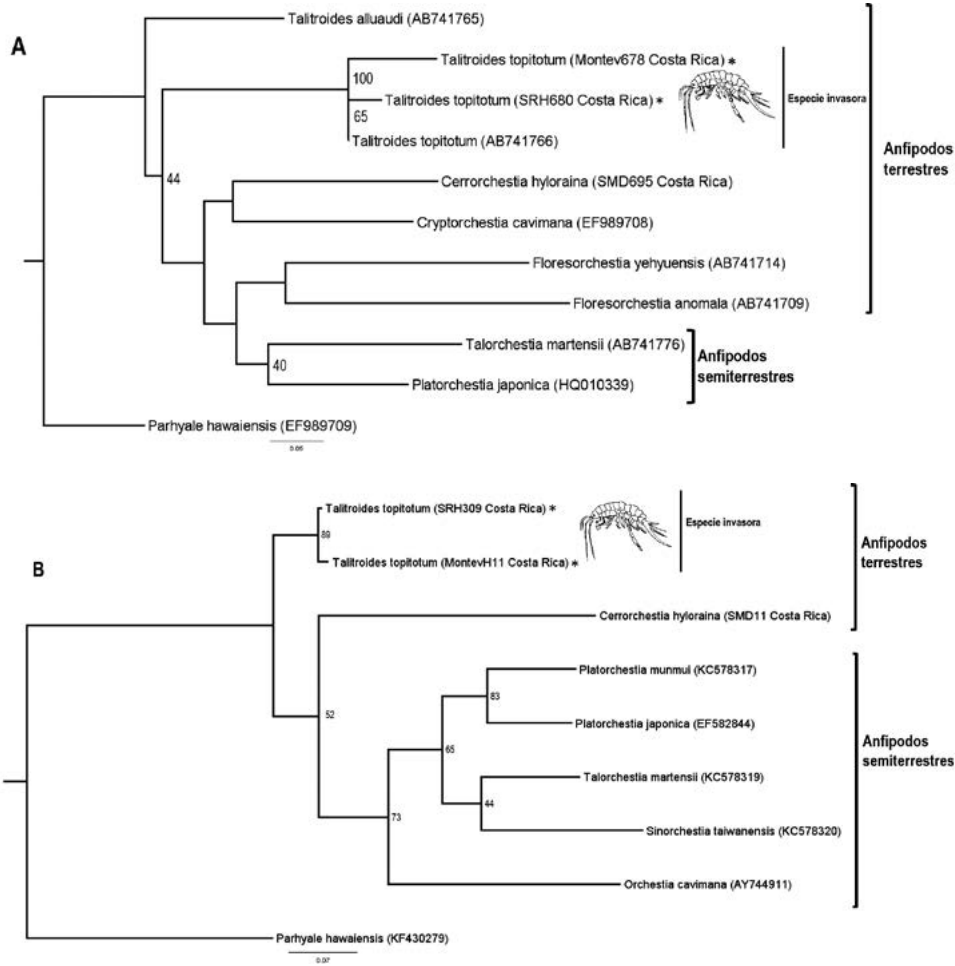


Figura 3. Árbol de posicionamiento taxonómico mediante máxima verosimilitud (ML), basado en secuencias parciales de **A)** gen de citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y **B)** gen de la subunidad ribosomal 16S, obtenidas del Genbank y del anfípodo terrestre *Talitroides topitotum* (secuencias de este estudio marcadas con un asterisco). El número en las ramas indica el valor de soporte *bootstrap* (porcentaje derivado de 2000 permutaciones). Valores de *bootstrap* menores al 40 % no se muestran en la topología. *Parhyale hawaiiensis* es definido como grupo externo. La región y código de colecta se muestran entre paréntesis para las secuencias de este estudio. Montev = Monteverde, SRH = San Rafael de Heredia, SMD = Santa María de Dota. Para las secuencias obtenidas del Genbank, los números de acceso se muestran entre paréntesis.

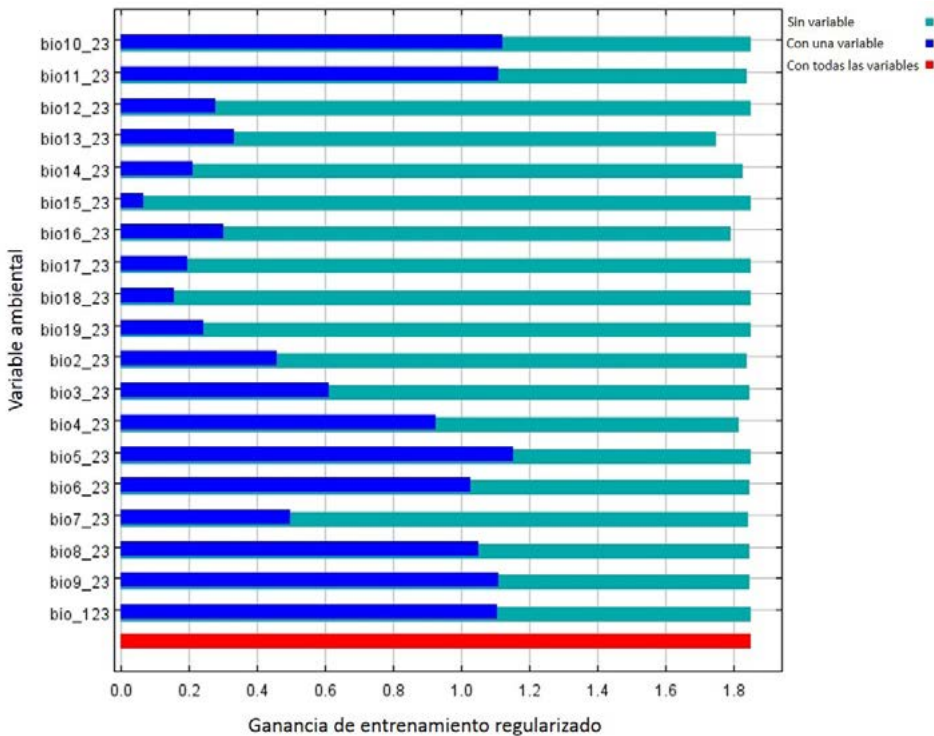


Figura 4. Ganancia de la prueba para las variables utilizadas en la determinación de la distribución potencial de *T. topitotum*, estimador de *Jackknife*.

especies que pueden estar compartiendo hábitats similares o coexistiendo, reforzando el hecho de que en Costa Rica se distribuyen únicamente dos especies de talítridos terrestres. Los resultados genéticos representados en las topologías de asociación taxonómica, son congruentes con la identificación fenotípica entre géneros de anfípodos terrestres reportados en Costa Rica, confirmándose la identidad genética de *T. topitotum* mediante los genes mitocondriales COI y 16S.

Se obtuvo un total de 29 registros de presencia de *T. topitotum*, que provienen de capturas directas, con los cuales se generó el modelo de distribución potencial, así como también 19 capas bioclimáticas, en donde cada una tuvo un valor de importancia para definir sitios potenciales de distribución. Según el análisis porcentual de la contribución e importancia de permutación de las variables ambientales y su grado de contribución al modelo de MaxEnt (Tabla Suplementaria 2) en orden de magnitud y por el porcentaje de contribución, se destacan las variables correspondientes a la temperatura media del trimestre más frío, la temperatura media del trimestre más cálido y la precipitación del mes más lluvioso (BIO11-10-13). Nótese en la figura 4 que, en cada iteración del algoritmo de entrenamiento, el aumento de la ganancia regularizada se agrega a la contribución de

la variable correspondiente o se resta de ella si el cambio al valor absoluto de lambda es negativo. Por otra parte, para el valor de permutación para cada variable ambiental, los valores de esa variable sobre la presencia de entrenamiento y los datos de fondo son permutados aleatoriamente.

En la figura 4 se muestran los resultados de la prueba Jackknife de importancia de la permutación de variables. En este caso, la variable ambiental con mayor ganancia cuando se usa aisladamente es BIO5 (temperatura máxima del mes más cálido), por lo que parece tener la información más útil por sí misma. La variable ambiental que disminuye la ganancia regularizada es BIO13 (precipitación del mes más lluvioso), por lo que parece tener la mayor cantidad de información que no está presente en las otras variables.

En la figura 5, se representa la distribución potencial a lo largo de Costa Rica (4305 km²), el color rojo en la escala indica una alta probabilidad de distribución y el color verde representa las zonas en las que existe una baja probabilidad. En este caso, las áreas que presentan mayor probabilidad se ubican en la cordillera volcánica central en altitudes entre los 1100 y 1900 m s.n.m. Por otra parte, el anfípodo terrestre podría distribuirse al noreste del valle central, específicamente hacia la cordillera de Guanacaste en las

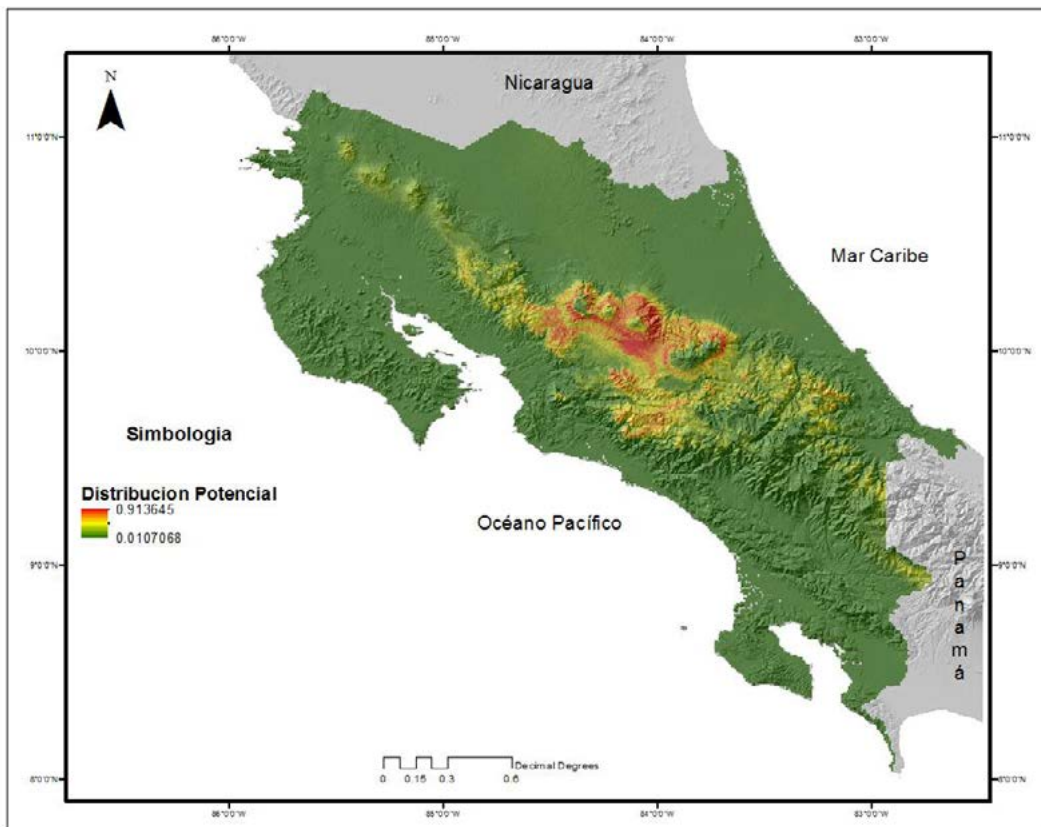


Figura 5. Distribución potencial de *Talitroides topitotum* en Costa Rica, utilizando el modelo de máxima entropía con puntos de ocurrencia, el color rojo indica una alta probabilidad de zonas idóneas para la presencia del anfípodo terrestre.

áreas de sucesión de los conos volcánicos Orosí, Cacao, Rincón de la Vieja, Miravalles, Santa María y Tenorio, al igual que hacia el sureste del país en la región Caribe, asociándose a elevaciones medias.

DISCUSIÓN

El anfípodo terrestre cosmopolita *T. topitotum*, tiene una amplia distribución en Costa Rica, no solo en las montañas del norte de Heredia (valle central) como lo reporta Alfaro-Montoya y Umaña-Castro (2013), sino que se extiende desde el noroeste de Costa Rica, pasando por la cordillera volcánica central (centro de Costa Rica), hasta el sureste (región Caribe). Sin embargo, se desconoce el momento y modo de introducción en el país, siendo esta una especie sinantrópica que posee una elevada capacidad de colonización, asociado a la abundancia de individuos hembras y juveniles reportados en las localidades donde se detectó la presencia de *T. topitotum*. En Costa Rica, se corroboró la observación de una población de anfípodos terrestres, presumiblemente *Talitroides topitotum*, en la zona de Monteverde, Puntarenas en el año 2006 (Jim Wolfe, comunicación personal). Lo que indica que, entre 1987 (no se reporta en la zona de Monteverde la especie *T. topitotum* por Lindeman y colaboradores) y en el 2006 (observación de presencia por Jim Wolfe) no se detectó la incidencia de este anfípodo introducido, al menos en la zona, lo que apunta a que la introducción de este anfípodo terrestre a Costa Rica fue en un rango de 12 a 31 años.

En Brasil, se observa una distribución de *T. topitotum* a lo largo de diferentes regiones del bosque Atlántico al sureste del país (Lopes y Masunari, 2004; Matavelli *et al.*, 2009 y Nascimento y Serejo, 2016). Esta distribución es básicamente en zonas de influencia costera con elevaciones de 0 a 1761 m s.n.m., igualmente como se reporta en la Isla de Java (Archipiélago de Indonesia), a una altitud de 1370 m s.n.m., en contraposición de la distribución mostrada en este estudio, la cual indica presencia de anfípodos terrestres en las cordilleras volcánicas que atraviesan el centro del país (de norte a sur), a una distancia promedio de 65 km de la costa Pacífico y Atlántico, similar al reporte de presencia de *T. topitotum* a 2475 m s.n.m. en el valle de México (centro sur, México) (Álvarez *et al.*, 2000).

Según Matavelli y Uehara-Prado (2014), en un estudio de tres bosques del Atlántico de Suramérica, la abundancia de *T. topitotum* podría ser un bioindicador de perturbaciones antropogénicas, concluyendo que, entre mayor abundancia del anfípodo invasor mayor es el impacto del ser humano en las zonas analizadas. En este sentido, observaciones y colectas realizadas en zonas poco o nada pobladas por el ser humano (Rincón de la Vieja, Braulio Carrillo, Finca Campbell Monteverde, Costa Rica) revelan una disminuida ocurrencia de *T. topitotum*, en contraposición con la alta densidad observada en zonas urbanas como la región montañosa al norte de Heredia (Alfaro-Montoya y Umaña-

Castro, 2013) y zonas como Zarcero, San Ramón y Fraijanes de Alajuela, Costa Rica. Por otro lado, se ha reportado que el mayor éxito de colonización de una especie invasora puede ocurrir en zonas que no son compartidas con especies nativas congénéricas (Ricciardi y Mottiar, 2006), esto concuerda con nuestros hallazgos debido a que en zonas específicas de ocurrencia de la especie de anfípodo endémico *Cerrochestia hyloraina*, no se tienen reportes de poblaciones mixtas co-habitando con *T. topitotum*. Sin embargo, el éxito de colonización del anfípodo invasor podría provocar un desplazamiento de especies nativas (Álvarez *et al.*, 2000) costarricenses. En Costa Rica, *T. topitotum* es ocurrencia en el 75 % de las zonas muestreadas. Además, la especie es altamente abundante en algunas zonas, como 423 individuos colectados, presentando abundancias proporcionales por sitio que van de 32 % hasta 100 % (hembras), 0 % (machos) y de 0 % hasta los 68 % (juveniles), mediante colectas exploratorias por localidad. Lo anterior demuestra la presencia de individuos hembras y la ausencia de machos, como lo describe Lopes y Masunari (2004b), Matavelli *et al.*, (2009) y Nascimento y Serejo (2016) para Brasil. La información molecular obtenida del anfípodo *T. topitotum* para las regiones mtCOI y 16S ADNr indica un posicionamiento taxonómico dentro del grupo de los talítridos terrestres, determinando su identificación por métodos moleculares, agrupando las secuencias genéticas de este estudio (para la región citocromo oxidasa I) con la única secuencia reportada en la base de datos genéticos Genbank (AB741766, 97 % de identidad) para *Talitroides topitotum*. Estudios en taxonomía y filogenética de anfípodos talítridos mediante análisis del gen mitocondrial COI, han facilitado el reconocimiento de unidades taxonómicas operacionales derivadas de datos moleculares, además de la agrupación filogenética de especímenes recientemente reportados para una localización específica (Wildish *et al.*, 2016, Davolos *et al.*, 2017). Por otro lado, la incorporación de secuencias genéticas de regiones mitocondriales del anfípodo terrestre nativo *Cerrochestia hyloraina* dentro de la topología molecular de localización taxonómica de *T. topitotum*, permite reforzar el hallazgo de dos anfípodos con características diagnósticas (Lindeman, 1991; Alfaro-Montoya y Umaña-Castro, 2013) y ocurrencia-distribución diferentes en Costa Rica, confirmando la presencia de dos taxones evolutivamente diferentes de talítridos terrestres.

Por lo anterior, se evidencia que la especie *T. topitotum* posee una alta capacidad de dispersión, como se ha evidenciado en el modelo de distribución potencial, estando presente en un amplio rango altitudinal, desde el norte del valle central atravesando el noreste del país hasta llegar al sureste del Caribe costarricense. Esta especie se presume, según el modelo de máxima entropía, estaría siendo mayormente favorecida por la temperatura: estimación soportada por observaciones locales que indican que *T. topitotum* se establece en rangos superiores a los 20 °C

(localidades del PNRV-C y PNBC-C); tal como se reporta en invernaderos de jardines botánicos en Alemania, Inglaterra y Holanda, la permanencia y establecimiento de *Talitroides* sp. (Vader, 1972). Por otro lado, elementos climáticos como la precipitación y la humedad, sumado a factores como la altitud, podrían favorecer el asentamiento y propagación de esta especie exótica cosmopolita (Álvarez *et al.*, 2000). En definitiva, se puede evidenciar que, tanto estos factores, como elementos del clima, son relevantes para determinar las áreas de distribución del anfípodo terrestre, por otro lado, el resultado del modelo presenta una correspondencia con los requerimientos ecológicos de *T. topitotum*. Por lo tanto, consideramos que los modelos de máxima entropía son análisis exploratorios que nos permiten crear escenarios a partir de datos reales, claves para la toma de decisiones de manejo o futuras investigaciones dirigidas al impacto en la invasión de especies introducidas, el potencial de distribución a mediano y largo plazo, así como posibles escenarios de desplazamiento y erradicación de especies nativas de anfípodos terrestres.

CONCLUSIONES

En este estudio se amplió la distribución de la presencia de *T. topitotum* en Costa Rica, observándose especímenes entre los 1900 a 595 m s.n.m., pero ausentes a elevaciones de 2130 m s.n.m. y hasta los 180 m s.n.m. Por otro lado, la abundancia proporcional de *T. topitotum* se inclina hacia las hembras y la presencia de juveniles; y en las 39 localidades exploradas no se detectaron individuos machos. En cuanto a los hallazgos moleculares, se obtuvo por primera vez la identidad nucleotídica de secuencias parciales del COI y ARNr 16S para individuos de *T. topitotum* en la región, lográndose un posicionamiento taxonómico de la especie dentro del agrupamiento de géneros de anfípodos terrestres, además la confirmación, mediante datos moleculares, de la presencia de dos taxas evolutivamente diferentes de talitridos terrestres en Costa Rica. Finalmente, se estableció por primera vez, una serie de sitios potenciales de distribución del anfípodo introducido mediante una prueba de máxima entropía para el modelaje de la distribución de especies, estableciéndose un rango de invasión de 4305 km², asociado a variables bioclimáticas y factores como la altitud. Nuestros hallazgos permiten establecer la identidad taxonómica de los anfípodos terrestres en Costa Rica y visualizar un panorama en cuanto al rango de distribución potencial de especies invasoras de peracáridos en la región y el desplazamiento de especies nativas asociado al establecimiento de especies no indígenas.

AGRADECIMIENTOS

A Juan B. Ulloa, Alexander F. Rojas, Luis E. Blanco y Franklin Chaves por su colaboración en las colectas de anfípodos terrestres. A la Familia Campbell, Stuckey y el Instituto Monteverde, Puntarenas, por permitirnos acceder a su finca

e instalaciones. A James Wolfe por cedernos el material visual de *T. topitotum*. A Renate Weidlich por sus dibujos y a Oscar Pacheco por las fotografías de especímenes frescos de *T. topitotum*. A Carolina Sancho por el soporte técnico en la obtención de las secuencias genéticas de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Alfaro-Montoya J, Umaña-Castro R. Primer registro e histología básica del anfípodo terrestre *Talitroides topitotum* (Amphipoda: Talitridae), introducido en las zonas montañosas de Heredia, Costa Rica. Res J Costa Rican Distance Educ Univ. 2013;5(2):209-215. Doi:10.22458/urj.v5i2.294
- Alvarez F, Winfield I, Cházaro S. Population study of the landhopper *Talitroides topitotum* (Crustacea: Amphipoda: Talitridae) in central Mexico. J Nat Hist. 2000;34(8):1619-1624. Doi:10.1080/00222930050117512
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;21:403-410. Doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Biernbaum, CK. Occurrence of the 'tramp' terrestrial amphipods *Talitroides topitotum* (Chevreux) and *T. topitotum* (Burt) (Amphipoda: Talitridae) in South Carolina. Brimleyana. 1980;3:107-111.
- Crandall K, Fitzpatrick J. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. Syst Biol. 1996;45(1):1-26. Doi:10.1093/sysbio/45.1.1
- Daneliya ME, Wowor D. Cosmopolitan landhopper *Talitroides topitotum* (Crustacea, Amphipoda, Talitridae) in Java, Indonesia. Check List. 2016;12(4):1933. Doi:10.15560/12.4.1933
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods. 2012;9(8):772. Doi:10.1038/nmeth.2109
- Davolos D, Maclean N. Mitochondrial COI-NC-COII sequences in talitrid amphipods (Crustacea). Heredity. 2005;94(1):81-86. Doi:10.1038/sj.hdy.6800529
- Davolos D, De Matthea E, Latella L, Vonk R. *Cryptorchestia ruffoi* sp. n. from the island of Rhodes (Greece), revealed by morphological and phylogenetic analysis (Crustacea, Amphipoda, Talitridae). ZooKeys. 2017;652:37. Doi:10.3897/zookeys.652.11252
- Eutrópio FJ, Krohling W. First record of Amphipoda *Talitroides topitotum* (Burt, 1934) (Gammaridea, Talitridae) in the state of Espírito Santo, Brazil. Acta Sci Biol Sci. 2013;35(1):37-39. Doi:10.4025/actascibiolsci.v35i1.12447
- Fick, SE y Hijmans RJ. Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. Int J Climatol. 2017;37(12):4302-4315. Doi:10.1002/joc.5086

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3:294-299.
- Friend JA, Richardson AMM. Biology of terrestrial amphipods. *Annu Rev Entomol.* 1986;31(1):25-48. Doi:10.1146/annurev.en.31.010186.000325
- Howart FG. Impacts of alien land arthropods and mollusks on native plants and animals in Hawaii. In: Stone C.P., Scott J.M., editors. *Hawaii's terrestrial ecosystems: preservation and management.* Honolulu: Cooperative National Park Resources Studies Unit, University of Hawaii; 1985, p. 149-179.
- Lima EABDF, Matavelli C, Ferreira CP, Godoy WAC. Ecological modeling of *Talitroides topitotum* (Crustacea: amphipoda). *J Biol Syst.* 2014;22(04):601-616. Doi:10.1142/S0218339014500223
- Lindeman D. New terrestrial amphipods (Crustacea: Amphipoda; Talitridae) from Mexico and Central America. *Can J Zool.* 1990;68:2323-2337. Doi: org/10.1139/z90-324
- Lindeman D. Phylogeny and zoogeography of the New World terrestrial amphipods (landhoppers) (Crustacea: Amphipoda; Talitridae). *Can J Zool.* 1991;69(4):1104-1116. Doi:10.1139/z98-220
- Lopes OL, Masunari S. Reproductive biology of *Talitroides topitotum* (Burt) (Crustacea, Amphipoda, Talitridae) from Serra do Mar, Guaratuba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool.* 2004;21(4):755-759. Doi:10.1590/S0101-81752004000400004
- Matavelli C, Uehara-Prado M, Leite FP, Freitas AV. Some aspects of the population ecology of the exotic amphipod, *Talitroides topitotum*, in an Atlantic Forest Reserve in Brazil. *Crustaceana.* 2009;82(2):241-251. Doi:10.1163/156854008X363777
- Matavelli C, Uehara-Prado M. High abundance of an exotic amphipod indicates disturbance in tropical rainforests. *Ecol Indic.* 2014;41:75-78. Doi:10.1016/j.ecolind.2014.01.033
- Mazzolari AC. Efecto del Cambio Climático en la distribución de especies vegetales invasoras en Costa Rica (Tesis de Maestría). Costa Rica: Instituto Internacional en Conservación y Manejo de Vida Silvestre. Universidad Nacional de Costa Rica; 2011. p. 24-26.
- Morino H. New records of the land-hopper, *Talitroides topitotum* (Burt, 1934) (Crustacea, Amphipoda, Talitridae), from subtropical East Asia. *Bull Natl Mus Nat Sci Ser A Zool.* 2013;39(4):193-201.
- Nascimento PSD, Serejo CS. Taxonomy and distribution of *Talitroides alluaudi* (Chevreux, 1896) and *T. topitotum* (Burt, 1934) (Amphipoda, Talitridae) in Atlantic rain forests of southeastern Brazil. *Nauplius.* 2016;24:1-17. Doi:10.1590/2358-2936e2016002
- Phillips S. J., Anderson R. P., Schapire E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Model.* 2006;190:231-259. Doi:10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026
- Rambaut A. FigTree v1.4 2012-2014: Tree Figure Drawing Tool. 2009 May. Available in: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Cited: May 4 2014.
- Richardson M. Altitudinal distribution of native and alien landhoppers (Amphipoda: Talitridae) in the Ko'olau Range, O'ahu, Hawaiian Islands. *J Nat Hist.* 1992;26:339-352. Doi:10.1080/00222939200770181
- Ricciardi A, Mottiar M. Does Darwin's naturalization hypothesis explain fish invasions? *Biol Invasions.* 2006;8(6):1403-1407. Doi:10.1007/s10530-006-0005-6
- Schubart C, Cuesta J, Felder D. Glyptograpsidae, a new brachyuran family from central America: Larval and adult morphology, and a molecular phylogeny of the grapsoidea. *J Crustacean Biol.* 2002;22(1):28-44. Doi:10.1163/20021975-99990206
- Stamatakis A, Ludwig T, Meier H. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinform.* 2005;21:456-463. Doi:10.1093/bioinformatics/bti191
- Vader W. Terrestrial Amphipoda collected in greenhouses in the Netherlands. *Zoologische bijdragen.* 1972;13.5:32-36.
- Weiss M, Macher JN, Seefeldt MA, Leese F. Molecular evidence for further overlooked species within the *Gammarus fossarum* complex (Crustacea: Amphipoda). *Hydrobiologia.* 2014;721(1):165-184. Doi:10.1007/s10750-013-1658-7
- Wildish DJ, Smith SR, Loeza-Quintana T, Radulovici AE, Adamowicz SJ. Diversity and dispersal history of the talitrids (Crustacea: Amphipoda: Talitridae) of Bermuda. *J Nat Hist.* 2016;50(29-30):1911-1933. Doi:10.1080/00222933.2016.1180719