



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A. C.**

**ASPECTOS ECOLÓGICOS Y MOLECULARES DEL  
CANGREJO TERRESTRE *Johngarthia planata*  
(STIMPSON, 1860) EN LA ISLA SAN PEDRO NOLASCO,  
SONORA, MÉXICO**

Por:

Ana Gabriela Martínez Vargas

TESIS APROBADA POR LA:

**COORDINACIÓN DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD Y  
APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES**

Como requisito para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

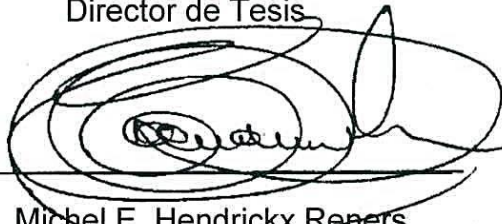
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la Bióloga Ana Gabriela Martínez Vargas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dr. Juan Pablo Gallo Reynoso  
Director de Tesis



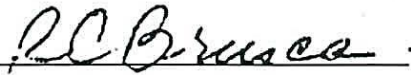
---

Dr. Michel E. Hendrickx Reners  
Asesor



---

Dra. Alejandra García Gasca  
Asesora



---

Dr. Richard C. Brusca  
Asesor



---

M.C. Janitzio Égido Villareal  
Asesor

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

---

**Dr. Pablo Wong González**

**Director General**

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por otorgarme la beca, la cual fue indispensable para la realización de este trabajo.

A CIAD, A.C. Unidad Guaymas por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar mi tesis de maestría, ayudándome en esta etapa a cumplir con mi preparación profesional. En particular al Dr. Juan Pablo Gallo por aceptarme y permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A CIAD, A.C. Unidad Mazatlán, en especial a mi asesora Dra. Alejandra García Gasca por permitirme usar el laboratorio de Biología Molecular y a la técnico Rubí Hernández por enseñarme las técnicas y manejo de los equipos para realizar los estudios moleculares requeridos en mi tesis.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología unidad Mazatlán, en especial a mi asesor Dr. Michel Hendrickx por permitirme utilizar la Colección Regional de Invertebrados Marinos de donde obtuve muestras para el estudio molecular.

Al Dr. Richard C. Brusca por su ayuda para entrar a la maestría y su apoyo durante la realización de la tesis. Muchas gracias por siempre ofrecerme su ayuda y conocimientos.

Un agradecimiento especial a Héctor Galindo Murrieta, por el apoyo y ayuda con el seguimiento académico y la obtención de la beca mixta que me permitió realizar la estancia de investigación.

Quiero agradecer a mi familia, por el amor y el apoyo que siempre me dan. A mi Mamá por cuidarme siempre, ayudarme y amarme hasta en el peor de mis humores. A mi Papá por ser mi ejemplo a seguir, por acompañarme a donde vaya, no importa lo lejos que esté y por siempre estar cuando te necesito. A mi hermana, por ser mi amiga y cómplice en las buenas y en las malas. Los amo.

A mi Will, Muchas gracias por estar siempre conmigo apoyándome sin importar donde esté y empujándome a ser mejor. ¡Ya termine Bu!

Gracias a mis compañeros y colegas. A Vicky García y Daniel Guevara por acompañarme en salidas de campo, escalar y caerse conmigo en la isla. A Eli Bressea, mi compañera en las noches de muestreo, gracias por compartir conmigo burritos y salchichas a las 3:00 am antes de volver a hacer los recorridos. A mi Rooms, Adrián Guido, por ser mi compañero en Mazatlán y mantenerme cuerda y muy bien alimentada en mi estancia.

Muchas gracias a la tripulación del barco “Mas Bravo”, al Capitán, Marcos y Vicente, por ayudarme en mis aventuras para poder bajar a la isla. También a Don José Luis, por llevarme a la isla siempre feliz de participar en estos proyectos y cuidarme desde la panga en las noches de muestreo.

Quiero agradecer en particular a mi amigo el ahora M.C. Eduardo Hernández Navarro por estar siempre conmigo y ayudarme desde a hacer árboles filogenéticos hasta a completarme para un caffino. Te quiero mucho amigo.

A todos muchas gracias por su apoyo y ayuda durante mi tiempo en la maestría, espero poder regresarles el favor.

## DEDICATORIA

*A mi familia, por quererme como soy y ayudarme a llegar donde estoy.*

## CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
Área de protección de flora y fauna islas del Golfo de California.....	<b>4</b>
Biodiversidad.....	<b>5</b>
Amenazas.....	<b>5</b>
Isla San Pedro Nolasco.....	<b>6</b>
Crustáceos Decápodos.....	<b>9</b>
Cangrejos Terrestres.....	<b>10</b>
Familia Gecarcinidae.....	<b>12</b>
<i>Johngarthia planata</i> .....	<b>13</b>
Estudios Ecológicos y de Biodiversidad.....	<b>15</b>
Importancia de los Estudios Moleculares.....	<b>16</b>
Filogenia de Crustáceos.....	<b>17</b>
Filogenia de la Familia Gecarcinidae.....	<b>17</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>20</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
Área de estudio.....	<b>21</b>
Censos de Población de <i>Johngarthia planata</i> (cangrejos moros).....	<b>23</b>
Estimación de Población.....	<b>22</b>

Estudio Molecular.....	24
Extracción de ADN Genómico.....	24
Amplificación de Fragmentos de ADNr por PCR.....	25
Electroforesis.....	26
Clonación y Secuenciación.....	26
Análisis Bioinformático.....	28
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>29</b>
Densidad de Población.....	29
Cuantificación de madrigueras de <i>J. planata</i> en la Isla San Pedro Nolasco.....	34
Actividades de los cangrejos <i>J. planata</i> al momento de la captura.....	38
Estudio de variación genética de <i>J. planata</i> .....	41
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Mapa de las islas del norte-centro Golfo de California, con un acercamiento a la isla San Pedro Nolasco.	<b>8</b>
<b>2</b>	Vista dorsal del cangrejo terrestre <i>Johngarthia planata</i> y vista ventral del cuadro bucal del mismo.	<b>14</b>
<b>3</b>	Zonas de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.	<b>22</b>
<b>4</b>	Individuos de <i>Johngarthia planata</i> encontrados en los meses de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.	<b>32</b>
<b>5</b>	Número de <i>J. planata</i> capturados y su relación con la humedad relativa en la zona de muestreo.	<b>33</b>
<b>6</b>	Número de madrigueras y su relación con la altura en msnm en la isla San Pedro Nolasco.	<b>37</b>
<b>7</b>	Actividades realizadas por <i>J. planata</i> durante un periodo de 24 horas de muestreo en el mes de diciembre 2013.	<b>39</b>
<b>8</b>	Actividad realizada por <i>J. planata</i> al momento de la captura en la isla San Pedro Nolasco por hora del día.	<b>40</b>
<b>9</b>	Electroforesis en Gel de agarosa al 2% mostrando amplificaciones de 16S mediante PCR.	<b>43</b>
<b>10</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando digestiones de clones recombinantes digeridos con la enzima <i>EcoRI</i> .	<b>43</b>

- 11**    *Árbol filogenético del fragmento de gen 18S de las especies*    **49**  
*Johngarthia planata* y *Gecarcinus quadratus* de Guaymas,  
Sonora.
- 12**    *Árbol filogenético de fragmento de gen 16S de las especies*    **51**  
*J. planata* y *G. quadratus* de diferentes localidades.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Número de organismos de <i>Johngarthia planata</i> encontrados por zona de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.	<b>30</b>
<b>2</b>	Número de madrigueras de <i>Johngarthia planata</i> encontradas por zona de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.	<b>35</b>
<b>3</b>	Claves de secuenciación de las muestras enviadas de <i>J. planata</i> y <i>G. quadratus</i> del gen 18S.	<b>43</b>
<b>4</b>	Claves de secuenciación de las muestras enviadas de <i>J. planata</i> y <i>G. quadratus</i> del gen 16S.	<b>44</b>
<b>5</b>	Análisis de similitud con las secuencias 16S de <i>J. planata</i> y <i>G. quadratus</i> en las bases de datos del GenBank del NCBI.	<b>45</b>
<b>6</b>	Análisis de similitud con las secuencias 18S de <i>J. planata</i> y <i>G. quadratus</i> de las bases de datos del GenBank del NCBI.	<b>46</b>

## RESUMEN

El cangrejo terrestre (*Johngarthia planata*) “moro rojo” se distribuye desde México hasta Colombia. Habita en zonas rocosas y construye sus madrigueras en suelos suaves, ha sido reportado a alturas de hasta 1,200 msnm. En México, habita en las islas del océano Pacífico, desde Baja California hasta Guerrero. En los límites de su distribución hacia el norte, en la isla San Pedro Nolasco, Guaymas, Sonora, se reportaron dos avistamientos en el año 2002 y 2005. Con el fin de estimar la población de *J. planata* y obtener registros de los recursos naturales de la isla San Pedro Nolasco, se realizaron censos en cinco zonas de la isla durante el periodo de mayo a diciembre del 2013, realizando conteos de organismos y madrigueras activas. Además se realizó un estudio molecular para comparar la población de *J. planata* de San Pedro Nolasco con poblaciones de islas a diferentes latitudes. La densidad estimada con el índice de Petersen fue de 0.07 individuos/m<sup>2</sup> para las zonas muestreadas, encontrándose una mayor presencia y madrigueras de *J. planata* a 30 msnm. La mayor actividad de los cangrejos al momento de su captura se registró en los rangos de las 02:00 a 04:00h y de 17:00 a 23:00 h, donde se les observó alimentándose de hojarasca de jjoba (*Simmondsia chinensis*) y de la enredadera (*Vaseyanthus insularis*) o transitando por la isla. En el estudio de variación genética se comparó la población de *J. planata* de la isla San Pedro Nolasco con muestras de colección de poblaciones de Mazatlán, Sinaloa y otra de Mezcales, Jalisco. Se compararon porciones del gen nuclear 18S y del gen mitocondrial 16S, encontrándose que con el gen 16S la muestra de Mazatlán marca pequeñas diferencias de las de Guaymas y Jalisco en el árbol filogenético.

## ABSTRACT

The land crab (*Johngarthia planata*) "moro rojo" is distributed from Mexico to Colombia. It inhabits rocky areas and builds burrows in soft soils; it has been reported up to 1,200 meters above sea level (masl). In Mexico, it inhabits the islands of the Pacific, from Baja California to Guerrero. Within the limits of their northern distribution, on the island San Pedro Nolasco, Guaymas, Sonora, two sightings in 2002 and 2005 were reported. In order to estimate the population of *J. planata* and obtain records of natural resources of the island San Pedro Nolasco, censuses were conducted in five areas of the island from May to December 2013, performing counts of organisms and active burrows. In addition, a molecular study was performed to compare the population of *J. planata* in San Pedro Nolasco with populations from islands at different latitudes. The estimated density, using the Petersen index, was 0.07 individuals / m<sup>2</sup> for the sampled areas. A higher incidence of sightings and active burrows of *J. Planata* were found at 30masl. The highest activity of the crabs was reported from 02:00 to 04:00h and again from 17:00 to 23:00 h, times when the crabs were observed feeding from litter of jojoba (*S. chinensis*) and a creeper plant (*Vaseyanthus insularis*) or transiting around the island. In the study of genetic variation, the population of *J. planata* from the island San Pedro Nolasco was compared with samples from Mazatlán, Sinaloa and Mezcales, Jalisco. Using a partial sequence of the nuclear gene 18S and the mitochondrial gene 16S we found that the sample from Mazatlán, Sinaloa presented differences from the samples from Jalisco and Guaymas, as shown in the phylogenetic tree.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de su evolución, los cangrejos terrestres han adquirido adaptaciones conductuales, fisiológicas y bioquímicas que les han permitido una independencia casi completa de los sistemas acuáticos. En los ecosistemas costeros, los cangrejos terrestres son de una relevante importancia, debido a que determinan la tasa de reclutamiento de algunas especies de plantas (Peter *et al.*, 1997), promueven el reciclaje de los nutrientes almacenados en el ecosistema al consumir hojarasca (Griffiths *et al.*, 2007) y la aireación del suelo a través de la construcción de madrigueras (Lindquist *et al.*, 2009). La presencia de estos crustáceos terrestres ha sido reportada en casi todas las islas del Pacífico tropical, con excepción de las islas de Hawaii atribuyendo esta ausencia a un fenómeno secundario generado por la colonización humana (Paulay y Stramer, 2011).

Los datos publicados sobre cangrejos terrestres se componen principalmente del conteo de las especies, algunos aspectos seleccionados sobre su conducta y su historia natural. Existen pocos estudios sobre la ecología básica de alguna de estas especies y sobre sus madrigueras, existiendo las notas taxonómicas de ciertos autores y sus descripciones personales (Bright y Hogue, 1972).

El cangrejo terrestre *Johngarthia planata* (Stimpson, 1860) comúnmente conocido como “moro rojo” está reportado en las islas del Pacífico oriental desde el Golfo de California hasta Colombia (Perger, *et al.*, 2013). En México, se ha reportado en islas adyacentes a la costa oeste, desde Baja California sur, islas Tres Marías y el Archipiélago de Revillagigedo (Hendrickx, 1995). Reportes puntuales son los de la isla Socorro, ubicada a 460 km al sur de la

península de Baja California en el Archipiélago de Revillagigedo (Jiménez *et al.*, 1994; Ortega-Rubio *et al.*, 1997; Pérez-Chi, 2005), y el de la isla Clipperton que es territorio francés (antes mexicano), pero que se ubica a 1,110 km al sudoeste de Michoacán (Bouchard y Poupin, 2009) y dentro del Golfo de California en una isleta de la Bahía de Baco-chibampo (Manrique, 1981).

Este cangrejo ha sido observado a diferentes altitudes, desde el nivel del mar hasta los 1,200 m en isla Socorro, relacionado con vegetación arbustiva como *Grewia insularis* y árboles como *Ficus cotinifolia*, registrando una densidad promedio de 0.12 cangrejos por m<sup>2</sup> (Jiménez *et al.*, 1994). Sin embargo no hay información disponible acerca de las variaciones estacionales de la densidad de población. Además, las observaciones de campo sobre su comportamiento diurno sugieren la necesidad de realizar registros detallados de actividad de 24 horas continuas (Jiménez *et al.*, 1994).

En la isla San Pedro Nolasco el Dr. Juan Pablo Gallo y su grupo han señalado el avistamiento de *Johngarthia planata*, observada por primera vez en noviembre del 2002 en el lado oeste de la isla. El organismo fue identificado por el M. en C. José Villalobos, utilizando fotografías tomadas en el sitio por H. Cabrera. En mayo del 2005 el Dr. Gallo reportó otro avistamiento del cangrejo del lado este de la isla, a 20 metros sobre el nivel del mar, alimentándose de *Perityle californica* y refugiándose en una madriguera dentro de una cueva. Estos cangrejos terrestres aparentemente se encuentran distribuidos en toda la isla, y pueden ser herbívoros de importancia ecológica en la isla (Felger *et al.*, 2011).

Con estos antecedentes nos propusimos realizar un estudio sobre los aspectos ecológicos y la variabilidad genética de este cangrejo terrestre, con el objetivo de aportar nuevo conocimiento sobre la especie *J. planata* en un ambiente árido, y además contribuir con esto al estudio de los recursos naturales de la isla San Pedro Nolasco, ya que es bien sabido que los estudios de la diversidad ecológica son imprescindibles como elemento para comprender el funcionamiento de los sistemas ecológicos y del medio natural en general.



## **ANTECEDENTES**

### Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California

El Golfo de California es uno de los mares más productivos del mundo. Cuenta con más de 900 islas, islotes e isletas que en conjunto suman cerca de 420,809 Ha. Todas ellas en su conjunto fueron decretadas como Zona de Reserva y Refugio de Aves Migratorias y Fauna Silvestre, el 2 de agosto de 1978. Tiempo después, el 7 de junio de 2000, se le dio una nueva categoría, llamada Área de Protección de Flora y Fauna. El reconocimiento de estas áreas de reserva por el gobierno mexicano aunado a la riqueza natural de estas zonas, fue decisivo para que todas las islas del Golfo de California formaran parte del programa internacional “El Hombre y la Biosfera” (MAB) así como de la Red Mundial de Reservas de la Biosfera de la UNESCO.

Las islas son de importancia nacional por ser un área notable de anidación, reproducción de aves y un corredor de especies migratorias. Son áreas ricas en especies endémicas y representan la mitad del territorio isleño nacional. Las islas del Golfo de California poseen una enorme riqueza biológica y ecológica de gran importancia económica para el país.

### Biodiversidad

Las islas del Golfo de California han sido reconocidas por la comunidad científica internacional como ecosistemas insulares ecológicamente más

intactos del mundo y de los pocos laboratorios naturales aún existentes. Su aislamiento y sus procesos naturales, permiten probar teorías concernientes a las formas de evolución, las tasas de extinción y la colonización de especies; así como, sobre las interacciones entre las especies y su adaptación a los ambientes insulares. Estas islas son ricas en especies endémicas (que no se pueden encontrar en ninguna otra parte del planeta), principalmente de cactáceas, reptiles y mamíferos (SEMARNAT, 2012).

### Amenazas

A pesar de que algunas islas presentan problemas de perturbación ecológica, se considera que en general las islas están bien conservadas y aún mantienen su flora y su fauna características. No obstante, la introducción de especies exóticas, particularmente ratas y gatos domésticos en varias de las islas ha producido situaciones de amenaza para varias especies de aves marinas como en la Isla San Pedro Mártir (Tershy *et al.*, 1997) y roedores como en la isla Dátil. Otro ejemplo, fuera de las islas del Golfo de California, pero muy notable en otras islas, es la introducción de cabras en la isla Socorro (Walter y Levin, 2008), lo que ha ocasionado que varias de las especies endémicas estén en proceso de extinción, como es el caso de *Papogyne tenuiflora* (INE, 1994).

Otro grave problema es la cacería, como en el caso del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) que estuvo sujeta a dicha presión, principalmente en las islas San Pedro Mártir, Ángel de la Guarda y San Lorenzo. La disminución en las poblaciones de lobo marino ha llevado a que la especie sea considerada bajo protección especial (Zavala-Gonzalez y Mellink-Bijtel, 2000).

Otra amenaza latente es la contaminación, principalmente por los desechos de insumos agrícolas que son arrastrados hacia el Golfo desde los

Estados Unidos y las zonas agrícolas de los estados de Sonora y Sinaloa en México. Hacia mediados del siglo XX, estos arrastres ocasionaron la disminución de las poblaciones de pelícanos en las islas Salsipuedes, Las Ánimas y San Lorenzo (SEMARNAT, 2012). Igualmente, se han reportado cambios en la salinidad del agua en la porción norte del Golfo, atribuyéndose este hecho a la calidad de las aguas del río Colorado (INE, 1994).

El que las islas del Golfo de California hayan sido consideradas como área de protección para la flora y la fauna, tiene una enorme importancia ecológica y biológica para México y el mundo, por lo que es de especial relevancia desarrollar planes de manejo para grupos de islas que reúnan características ecológicas similares y en algunos casos planes concretos para cada isla. Esto permitirá proteger aún mejor a las que están bien conservadas y restaurar las que lo requieran.

#### Isla San Pedro Nolasco

La isla San Pedro Nolasco (27°58'05"N 111°22'44"O) está localizada en la parte central del Golfo de California, aproximadamente a 14.6 km al oeste del territorio continental y a 40 km de Guaymas, Sonora. Se compone de una montaña estrecha de 4.2 km de largo, con orientación norte-sur, y no más de 1.5 km de ancho, que abarca alrededor de 3.45 km<sup>2</sup>. Una cresta prominente, alcanza un máximo de 315 m de altura, se presenta a lo largo de la mayor parte de la longitud de la isla. A cada lado de la cresta, el terreno rápidamente cae en el mar. Hay varios cañones cortos y empinados, pero no hay abanicos aluviales (Figura 1). La isla tiene un pequeño manantial de agua dulce y hábitats que no tienen igual en ninguna otra parte de la región del Golfo de California. Cincuenta y ocho especies de plantas con 52 géneros y 27 familias se encuentran en esta

isla, la mayoría de las cuales también ocurren en otras áreas del estado de Sonora y la Península de Baja California. Cuatro especies endémicas de esta isla representan, junto con Isla Ángel de la Guarda, los niveles de endemismo más altos observados en una sola isla dentro del Golfo de California (Felger *et al.*, 2011). La costa es abrupta, y la única playa se encuentra en la Cala Güina, una pequeña ensenada en la parte sureste de la isla, se compone de adoquines. Acantilados escarpados y laderas escarpadas de roca expuesta llegan directamente hasta el agua, por lo que las plantas halófitas están ausentes en la isla. A lo largo de todo el lado este de la isla sólo hay dos accesos por tierra: la ensenada Cala Güina y el otro en aproximadamente un tercio de la distancia desde el extremo norte de la isla en la localidad conocida como el Farito (Felger *et al.*, 2011).

Esta isla se encuentra deshabitada por completo. La parte terrestre alberga especies endémicas de reptiles y pequeños roedores, además tiene una de las colonias más importantes de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California y una zona de anidación de bobo café (*Sula leucogaster*) y pelicano café (*Pelecanus occidentalis*). En 2005, la isla fue clasificada junta con otras 244 como Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO (<http://whc.unesco.org/fr/list/1182/>).



**Figura 1.-** Mapa de las islas del norte-centro Golfo de California, con un acercamiento a la isla San Pedro Nolasco.

## Crustáceos Decápodos

Los crustáceos (Crustacea, del latín *crusta*, “costra” y *aceum*, “relación o la naturaleza de algo”), se denominan así porque, especialmente en las especies terrestres más grandes, sobre el exoesqueleto se depositan sales calcáreas que les proporcionan una gran dureza. Forman un extenso subfilum de artrópodos, con más de 67,000 especies y sin duda faltan por descubrir un gran número más. Incluyen varios grupos animales conocidos, como las langostas, los camarones, los cangrejos, los langostinos y los percebes (Brusca y Brusca, 2002).

Los crustáceos son uno de los grupos zoológicos con mayor éxito biológico, tanto por el número de especies vivientes como por la diversidad de hábitats que colonizan; dominan los mares, como los insectos dominan la tierra. Los crustáceos más pequeños conocidos hasta ahora, miden 100  $\mu\text{m}$  de longitud y habitan en las anténulas de los copépodos. Los de mayor tamaño son los cangrejos araña japoneses (*Macrocheira kaempferi*), sus patas llegan a medir más de 2 metros de largo, cantidad que, sumada al comparativamente pequeño cuerpo, le otorga un diámetro de hasta cuatro metros. (Brusca y Moore, 2003).

Los crustáceos son fundamentalmente acuáticos y habitan en todas las profundidades, tanto en el medio marino, como en el estuarino (salobre) y de agua dulce, sin embargo, unos pocos han colonizado el medio terrestre (Burgenn, 1998). Son importantes en la cadena alimentaria, en parte porque muchos se alimentan de plantas y animales pequeños. Otros muchos filtran partículas de comida del agua, pero los crustáceos de mayor tamaño, como la quisquilla, el camarón y los cangrejos, son a menudo omnívoros, carroñeros o

depredadores. Hay también varias especies parásitas dentro de grupos tales como los copépodos, los cirípedos y los isópodos (Brusca y Brusca, 2002). En el Golfo de California se calcula que coexisten alrededor de 1,029 especies de macrocrustáceos, particularmente de los grupos de los géneros Peracarida y Decapoda. Representan un componente muy importante de la fauna bentónica y pelágica de la región (Hendrickx *et al.*, 2002). Existen evidencias de que los crustáceos ayudan en un principio a la dispersión de esporas y facilitan la sucesión y la longevidad de plantas, macroalgas e invertebrados sésiles, además mantienen a otros organismos como peces y aves acuáticas con alimento disponible (Brawley, 1992).

### Cangrejos Terrestres

Los cangrejos terrestres son un excelente ejemplo de evolución del mar a la tierra, así como de la liberación ecológica de las islas oceánicas, donde la mayoría de estas islas albergan biotas inusuales y vulnerables como consecuencia del aislamiento. Es bien reconocida la evolución que han desarrollado los cangrejos terrestres para ser capaces de permanecer activos fuera del agua por largos períodos de tiempo, adaptándose a los ambientes terrestres, mediante modificaciones fisiológicas, morfológicas y ecológicas, como el desarrollo de las cavidades branquiales parecido a los pulmones, que utilizan para el intercambio de gases, habitando madrigueras profundas y con alta humedad, (Hartnoll, 1988; Burggren y McMahon, 1988). Los cangrejos terrestres varían en su nivel de adaptación, incluso entre especies de la misma familia. Algunas especies requieren de regulares inmersiones en el agua, mientras otras pueden obtener el agua del alimento o de substratos del suelo, a través de la absorción (Hartnoll, 1988). La mayoría de los cangrejos terrestres son plantónicos en su etapa larval (Wolcott, 1988).

Numerosos cangrejos terrestres limitan su hábitat a las islas oceánicas, donde pueden ser especies clave de los bosques costeros, ocupando asociaciones características de los vertebrados en los continentes (Paulay y Stramer, 2011). Restringidos a islas, los cangrejos terrestres pueden ser los miembros dominantes de la biota terrestre. Son depredadores importantes de aves jóvenes e invertebrados, afectan la dispersión de semillas, controlan la descomposición de la hojarasca, y son agentes importantes en el ciclo de los nutrientes (Lindquist *et al.*, 2009). Es por ello que la pérdida de cangrejos terrestres puede dar lugar a cambios a gran escala en la estructura comunitaria de una isla (Atkinson, 1985).

Se ha reportado la presencia de cangrejos terrestres en ecosistemas costeros tropicales de todo el mundo (Lindquist *et al.*, 2009), con excepción de las islas de Hawaii, donde no se encuentran, atribuyendo su ausencia a un fenómeno secundario, generado por la colonización humana (Paulay y Stramer, 2011).

En general, los crustáceos decápodos no han tenido mucho éxito en la tierra. Lo que les impide convertirse en un miembro importante del bioma terrestre, principalmente debido a la depredación por parte de los carnívoros terrestres, especialmente los vertebrados, que son un importante factor en la limitación de su éxito (Hartnoll, 1988). Confirmando la conclusión de Vermeij y Dudley (2000) que las transiciones macro-evolutivas entre los hábitats de especies marinas a terrestres son comunes, pero rara vez conducen al éxito a largo plazo en el hábitat invadido.



## Familia Gecarcinidae

Gecarcinidae es una familia de cangrejos verdaderos que consiste de 25 especies conocidas a la fecha (Peter *et al.*, 2008), que se han adaptado a la existencia terrestre. Esta familia es conocida comúnmente como la de los cangrejos terrestres. Al igual que todos los otros cangrejos, los cangrejos terrestres poseen una serie de branquias. Además, la parte del caparazón que cubre las branquias se infla y está equipado con vasos sanguíneos. Estos órganos extraen el oxígeno del aire de forma análoga a los pulmones de los vertebrados. Los cangrejos adultos son forzosamente terrestres, visitando de manera periódica el mar, donde se reproducen y sus larvas se desarrollan. Estos cangrejos son tropicales y omnívoros (Peter *et al.*, 1997).

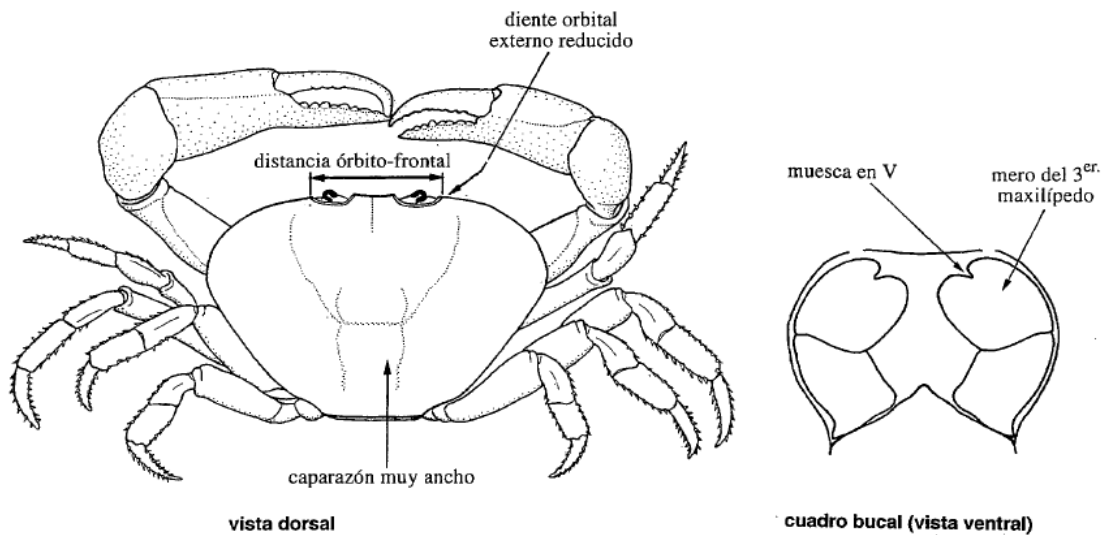
En algunos ecosistemas la macrofauna, entre la cual se considera a los cangrejos, puede alterar la densidad de la población de algunas especies de plantas, debido a la depredación de semillas y plántulas (Peter *et al.*, 1997). En el caso de los cangrejos terrestres, en particular la familia Gecarcinidae, cuentan con escasos registros sobre su papel ecológico en la formación y aporte a la dinámica de los ecosistemas que ocupan, a pesar de su considerable presencia (Sherman, 2002). En un estudio realizado por Jiménez *et al.* (1994), se reporta una correlación negativa entre las densidades de *Johngathia planata* y plantas jóvenes en la Isla Socorro, México. En otro trabajo García-Franco *et al.* (1991), reportan a *Gecarcinus lateralis*, consumiendo propágulos de *Bromelia* spp en Veracruz, México. También Delfosse (1990), en un estudio no publicado de sus datos preliminares, deduce un impacto negativo de *G. lateralis* sobre las densidades de plántula, también en Veracruz. Estos estudios demuestran que los cangrejos terrestres desempeñan funciones ecológicas importantes en sistemas forestales y costeros.

### ***Johngarthia planata***

Es esencialmente una especie insular que se distingue fácilmente por el color del caparazón, siendo de color naranja brillante al rojo. El desarrollo larvario completo de *J. planata* consiste de cinco estadios zoea y uno de megalopaque se desarrolla en 31 días, después comienza su etapa terrestre (Cuesta *et al.*, 2007). Puede encontrarse desde la orilla del mar hasta los 1200 m de altura (Jiménez *et al.*, 1994), pero su hábitat típico son las zonas rocosas con cuevas excavadas bajo las raíces de árboles y en suelos suaves por encima de la marea más alta, frecuentemente asociada con la vegetación costera (Ortega-Rubio *et al.*, 1997). También es común encontrarlos bajo raíces o troncos y entre vegetación muerta. Se alimentan de noche y buscan refugio en madrigueras poco profundas que según Pérez-Chi (2005) pueden variar de forma dependiendo del sustrato en que las excaven. Prefieren zonas con vegetación arbustiva o arbórea y sus madrigueras van de 20 a 42 cm de profundidad en formas de J o U horizontales. Madrigueras en sustratos muy rocosos son escasas o nulas, ya que en estos casos prefieren ocupar ranuras naturales (Pérez-Chi, 2005).

Se encuentra típicamente en las islas cercanas al litoral, incluyendo el centro del Golfo de California, isla Socorro e isla Clarión del Archipiélago Revillagigedo en México, la isla de Gorgona en Colombia e isla Clipperton (isla en posesión francesa ubicada en el océano Pacífico). Hasta el momento no se ha informado de ninguna verdadera localidad continental (es decir, ocurre cerca de la costa y en islas recientemente conectadas al continente por muelles artificiales). Muchos de los registros “continentales” corresponden a ejemplares recolectados en islotes cercanos a la costa.

Unas de las características descriptivas del cangrejo moro, es que presenta un caparazón mucho más ancho que largo. Los ojos ubicados muy céntricos, las orbitas son angostas, de forma casi circular; la distancia órbito-frontal (entre los bordes externos de las órbitas) inferior a la mitad de la anchura del caparazón; diente orbital externo reducido a un tubérculo; borde inferior de la órbita con una profunda fisura. El carpo del quelípedo es liso o con una pequeña cresta dentada en el ángulo antero-lateral. Mero del tercer par de maxilípedos alargado, con una muesca profunda en forma de “V” en el margen anterior (Fisher *et al*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2.-** Vista dorsal del cangrejo terrestre *Johngarthia planata* y vista ventral del cuadro bucal del mismo (según Fisher *et al*, 2005).

Color: La tonalidad del cuerpo es de un rojo vívido o café rojizo, a veces con maculas de color púrpura. Periópodos rojo-púrpura, con el dactilo rojo oscuro. Región ventral amarillenta. Talla Máxima: 10.4 cm (macho) y 8,2 cm (hembra) de anchura de caparazón (tallas máximas conocidas) (Hendrickx, 2005). Pesca y utilización: No es objeto de explotación regular. Su gran abundancia en las islas y su talla relativamente grande permiten suponer que es aprovechado ocasionalmente por lo menos a nivel de subsistencia, pero no es un recurso abundante como por ejemplo la jaiba (*Callinectes* spp.).

### Estudios Ecológicos y de Biodiversidad

En la actualidad el término biodiversidad es común, con él se hace referencia a la variedad de especies animales y vegetales en el medio ambiente. Acciones del hombre tales como destrucción, la fragmentación y la degradación de hábitats; la contaminación, la sobreexplotación de especies, la introducción de especies exóticas o la propagación de cultivos transgénicos, las enfermedades y las plagas ponen en peligro la biodiversidad. Por esto resulta fundamental la utilización sostenible de los ecosistemas y sus diferentes hábitats; no sólo aquellos donde la biodiversidad sea elevada, sino también otros donde la rareza o la presencia de especies endémicas o en peligro sea su valor destacable.

En conservación se suele hablar de especies, pero no se deben olvidar los hábitats. Las especies que se desean conservar se asientan en una trama compleja de interacciones que podemos definir como su hábitat. Por ello, en la conservación de la biodiversidad de las especies se debe poner un enfoque particular a la conservación de sus hábitats.

Una especie podría tener una importancia ecológica fundamental en el mantenimiento de la biodiversidad de una zona, por lo que podría ser calificada como especie clave por la importante función que desempeña, o inclusive puede ser vital dentro de una comunidad para la existencia de otras especies dentro de esa comunidad, por lo que los estudios poblacionales de especies clave y de la diversidad de especies en una comunidad, aportan información valiosa para diseñar estrategias de conservación adecuadas.

### Importancia de los Estudios Moleculares

La biología molecular es una herramienta importante que hoy en día es usada ampliamente para estudiar y comprender la estructura y la función de los organismos. Los métodos de caracterización genética de los individuos, las poblaciones y las especies han proporcionado poderosas herramientas para hacer frente a las innumerables preguntas sobre la fascinante historia natural. Además, los métodos moleculares han facilitado el análisis de los patrones de variación genética en las poblaciones naturales y proporcionan una oportunidad sin precedentes para el estudio empírico de la evolución y los procesos demográficos que la forman. Además, mediante estos estudios también se han propuesto nuevas clasificaciones para los cangrejos, que anteriormente solo se dividían mediante claves taxonómicas. Los estudios de variación genética en especies con amplias distribuciones latitudinales y sometidas a ambientes diferentes representan un acontecimiento importante de la biología evolutiva en organismos marinos (Pascual *et al.*, 2012; Schubart *et al.*, 1999).

## **Filogenia de los Crustáceos**

La diversidad genética de los organismos se mide a través de marcadores moleculares que corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable y que además puede detectarse fácilmente. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Solís-Ramos y Andrade-Torres, 2005). Los marcadores de ADN pueden ser de ADN nuclear (ADNn) o mitocondrial (ADNmt) (Arif y Khan, 2009). Shih *et al.* (2011) señalaron que las secuencias de ADNmt son apropiadas para evaluar la estructura genética y la filogeografía pues tienen las siguientes ventajas: hay miles de copias del ADNmt en cada célula, son haploides y se hereda únicamente por línea materna (Waples *et al.*, 1999 citado en Ewald, 2006), se degradan más lentamente que el ADNn y evolucionan hasta 10 veces más rápido que el ADNn (Shih *et al.*, 2011; Ewald, 2006).

El ADN mitocondrial (ADNmt) de los crustáceos es similar al del resto del reino animal. Se trata de una molécula de ADN haploide que se hereda por vía materna y tiene un tamaño que oscila entre 15,000 a 17,000 pares de bases (pb) con una forma cerrada o circular. El ADNmt codifica 37 genes, de los cuales dos son genes ribosomales (12S rADN y 16S rADN), 22 son genes que codifican para ARN de transferencia (ARNt) y 13 son genes que codifican para proteínas, entre ellos las de la citocromo oxidasa (Ewald, 2006).

## **Filogenia de la Familia Gecarcinidae**

Hasta el momento la clasificación taxonómica de los cangrejos de la familia Gecarcinidae se basa en la descripción de la morfología de los

organismos adultos. Algunos de ellos se definen de forma ambigua o basadas en características posiblemente plesiomórficas o convergentes (Balss, 1957). Estudios recientes sobre la morfología larval comparativa de la familia Grapsidae han reclasificado a varias especies en diferentes géneros y se han definido nuevos géneros (Cuesta *et al.*, 2000), lo que demuestra los beneficios de utilizar métodos más precisos para la clasificación de las especies, como lo es a través de herramientas moleculares.

Uno de los primeros usos de las herramientas de la biología molecular en la clasificación de los cangrejos no marinos fue un estudio de filogenia molecular entre algunos géneros de la familia Grapsidae (Schubart *et al.*, 1999), pero pocos trabajos han seguido con este tipo de estudios.

Hay pocos estudios sobre la filogenia de los cangrejos terrestres. Se han realizado algunos estudios como el de Schubart *et al.*, (2000), para ayudar a resolver relaciones filogenéticas entre estos cangrejos altamente adaptables y estudios de población de estos utilizando principalmente porciones del genoma mitocondrial que corresponde al gen 16S rRNA. Mediante estos estudios también se han propuesto nuevas clasificaciones para los cangrejos, que anteriormente solo se dividían mediante claves taxonómicas basadas en caracteres morfológicos.

## JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre la biodiversidad de los ecosistemas permite documentar y representar la riqueza ecológica de diferentes zonas. El cangrejo moro rojo es un cangrejo terrestre abundante y de importancia ecológica que tiene un amplio rango de tolerancia a diferentes ambientes. La caracterización de la población de *J. planata* en una isla con un ambiente meramente desértico, ampliará el conocimiento sobre esta especie y permitirá entender mejor el nicho que este cangrejo ocupa.

## HIPÓTESIS

La Isla San Pedro Nolasco presenta zonas (cañadas) en donde la humedad del sustrato (debido a la sombra) hace posible una mayor cobertura vegetal, favoreciendo la presencia del hábitat para el cangrejo moro rojo (*Johngarthia planata*), por lo cual se espera que en las zonas con estas características de cobertura vegetal se encuentre la presencia de esta especie.



## OBJETIVOS

### Objetivo General

Caracterizar ecológica y genéticamente a la población de *Johngarthia planata* de la isla San Pedro Nolasco.

### Objetivos Específicos

1. Estimar la población de *J. planata* en la isla San Pedro Nolasco
2. Evaluar el comportamiento de *J. planata* en relación al tiempo (horas).
3. Comparar la población de *J. planata* de la isla San Pedro Nolasco con poblaciones a diferentes latitudes de su área de distribución.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

La isla San Pedro Nolasco se encuentra a 14.6 km al oeste del territorio continental de Sonora (Coordenadas 27° 58' 12" N -111°22' 30" W), y 40 km de la comunidad de Guaymas, Sonora. En los 3.45 km<sup>2</sup> de la superficie de la isla, se seleccionaron cinco zonas de posible acceso y que presentaban características favorables para la presencia de *J. planata* (Figura 3). Estas zonas de aproximadamente 500 m<sup>2</sup> cada una, fueron: ensenada el Farito (zona 1, N 27° 58'22" - W 111°22'36"), lobera de El Farito (zona 2, N 27° 57'86"- W 111° 22'93"), arroyo de las Guacamayas (zona 3, N 27°57'87" - W 111°22'93"), arroyo de las Iguanas (zona 4, N 27° 58'00" - W 111°23'01"), arroyo de Mellink (zona 5, N 27° 58'21" - W 111° 23'02" ).

# Isla San Pedro Nolasco



**Figura 3.-** Zonas de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.

### Censos de Población de *Johngarthia planata* (cangrejos moros)

Se realizaron visitas durante los meses de mayo, julio, septiembre, noviembre y diciembre de 2013 a las cinco zonas de la isla que fueron seleccionadas. En estas visitas se realizaron recorridos en todas las áreas con posible presencia de cangrejos, de acuerdo a la topografía, iniciando con la zona en donde fue observado el primer cangrejo en el 2002 en el arroyo de las Guacamayas. Los censos fueron realizados de 24 horas con recorridos cada tres horas. Los cangrejos encontrados fueron capturados y marcados con tinta indeleble y liberados posteriormente en el mismo lugar donde se encontraron. Se registraron las coordenadas del sitio de captura y la descripción de la actividad que realizaba el cangrejo al momento de su captura.

#### Estimación de Población

La densidad de la población los cangrejos moros se calculó utilizando el índice de Petersen de marca y recaptura (Bailey 1952).

$$N = M \frac{(n+1)}{m+1}$$

Dónde:

N = tamaño de la población

M = individuos marcados (primera muestra)

n = número total de individuos en la segunda muestra

m = individuos marcados que son recapturados.

Este índice de Petersen (también llamado índice de Lincoln o índice de Lincoln-Petersen) se utilizó para la estimación de la población de *J. planata* en la isla Socorro (Jiménez *et al*, 1994), y fue elegido debido a su simplicidad, precisión y eficiencia.

## Estudio Molecular

### **Extracción de ADN Genómico**

Se obtuvo el ADN genómico del músculo de cinco organismos de *J. planata* recolectados en la isla San Pedro Nolasco, cinco muestras de esta misma especie de Mazatlán y una de Mezcales, Jalisco, obtenidas de la Colección Regional de Invertebrados Marinos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología unidad Mazatlán. Además se tomaron muestras de un organismo de *Gecarcinus quadratus* recolectado en la zona de Las Tinajas en Guaymas, Sonora y cinco muestras de *G. quadratus* recolectados en Mazatlán, tomados de la misma colección del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología unidad Mazatlán.

Se tomó tejido muscular de los organismos y se incubó en 400 µl de buffer de lisis (5M NaCl, 1M Tris pH 8, 0.5M EDTA pH 8 y 10% SDS) y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a 65°C por 30 min y después se maceró para después añadirle 200 µl de NaCl saturado (~ 6 M). Se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, después se transfirieron 600µl de sobrenadante a un tubo con 1ml de etanol absoluto, el cual se agitó suavemente para precipitar el ADN. Se centrifugó de nuevo a 13,000 rpm por 10 minutos, se lavó el ADN en etanol al 70% y se volvió a centrifugar por 5 min. Se desechó el etanol y el ADN se re suspendió en 100 µl de TE (Tris-EDTA). Se corrió un gel de agarosa al 7% para verificar la extracción del ADN y antes hacer el PCR se hizo una dilución de 1:10 con TE, se incubó a 95°C por 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo.

## **Amplificación de Fragmentos de ADNr por PCR**

La amplificación selectiva de un fragmento de los genes ADNr 18S y 16S se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la elaboración de los PCR se realizó una mezcla compuesta por 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.132 mM dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), 1X buffer para PCR, 0.4 μM de primer F, 0.4 μM de primer R y 0.5 U de Go-Taq (Promega). De esta mezcla se colocaban 11.5 μl en 12 microtubos para PCR y se les agregaba a cada uno 1 μl de ADN 1:10 de muestra. Debido a que los primers para el gen 18S son universales para eucariontes, se colocó un control positivo que consistió en ADN genómico de *Lepidochelys olivacea* y un tubo sin ADN como muestra negativa.

Para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial 16S se utilizaron los primers 16Sar-F (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT- 3') y 16H16-R (5'-TTATCRCCCAATAAAATA- 3') (Schubart *et. al.*, 1999). Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 94°C por 2 minutos y 40 ciclos de 94°C 1 minuto, 55°C 1 min y 72°C 2min.

El gen nuclear 18S fue amplificado con los primers 18S-F (5'CTGAACTGGGGCCATGATTAAGAG3') y 18S-R (5'GGTATCTGATCGTCGTCGAACCTC3'). Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 94°C por 2 minutos y 35 ciclos de 94°C 1 min, 57°C 1 min y 72°C 1 min.

## **Electroforesis**

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% usando una solución amortiguadora TAE(Tris Acetato-EDTA). Posteriormente, los geles fueron teñidos con GelRed™ al 1x y se analizaron con un sistema de imágenes de gel (BIO-RAD Molecular Imagen ChemiDoc XRS+).

## **Clonación y Secuenciación**

Una vez visualizados los fragmentos, éstos se purificaron utilizando un kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System de Promega. Se cortó la banda del gel de agarosa con una navaja estéril, se colocó en un tubo eppendorf y se pesó. Se agregaron 10µl de membrane binding solution por cada mg de agarosa y se incubó entre 50 y 65°C por 10 minutos o hasta que la agarosa se disolviera (se le daba vórtex a la mezcla cada 3 minutos para agilizar el proceso). El producto del gel se transfirió a una columna que tenía una membrana y tubo colector (provistos por el kit) y se dejaba incubar un minuto, después se centrifugaba a 12,000 rpm un minuto y se descartaba el residuo. Se hacía un lavado con 700µl de Membrane Wash Solution y se centrifugaba 5 minutos a 12,000 rpm y se descartaba el residuo de lavado, se repetía el lavado con 500µl de Membrane Wash Solution y se centrifugaba con las mismas condiciones. Se realizó una centrifugación final en seco y la columna se transfirió a un tubo eppendorf estéril, se agregaron 20µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, se dejó incubar un minuto, para después eluir por centrifugación y almacenar a -20°C.

Una vez purificados los fragmentos, se procedió a ligarlos al vector de clonación pGEM-T easy vector, utilizando T4 DNA ligasa e incubando 2 horas a temperatura ambiente y almacenando a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El vector conteniendo la secuencia de interés (plásmido), se introdujo a células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante choque térmico a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos. Transcurrido este tiempo, las células fueron inoculadas en medio SOC (Super Optimal broth with Catabolic repressor) e incubadas por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Estas células se crecieron en placas con agar LB (medio Luria-Bertani) adicionado con 1.2 ml de ampicilina (25 mg/ml) en 500 ml de agar.

La inserción del plásmido en las bacterias reprime la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa dentro de la región  $\alpha$ -péptido. La inactivación por inserción permite la identificación de recombinantes por detección de coloración azul (colonias sin inserto) o blanco (colonias con inserto). Se seleccionaron las colonias blancas y posteriormente se inocularon en caldo LB adicionado con ampicilina y se dejaron incubando toda la noche. Transcurrido este tiempo se realizó la extracción del ADN plasmídico siguiendo la técnica de Lisis Alcalina (Minipreps). Se transfirieron 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf, se centrifugó un minuto a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 100  $\mu\text{l}$  de Cell resuspension solution, después se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (200mMNaOH y 1% SDS). Se agregó buffer de neutralización (3M acetato de potasio pH. 5.5), se mezcló por 3 minutos y se centrifugó a máxima velocidad. El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf y se le agregaron 200  $\mu\text{l}$  de isopropanol, se centrifugó un minuto a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. Se le agregaron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, se mezcló y se volvió a centrifugar por un minuto, descartando el sobrenadante. Se re suspendió el pellet en 25  $\mu\text{l}$  de agua estéril y posteriormente, confirmar la presencia del inserto, se realizó una digestión del plásmido preparando una mezcla de 9  $\mu\text{l}$  por muestra formada por 7.1  $\mu\text{l}$  de



H<sub>2</sub>O 18Ω estéril, 1 µl de buffer H 10X (Promega), 0.1 µl de BSA (Bovine Serum Albumin) 100X y 0.8 µl de la enzima de restricción EcoRI. A esta mezcla se le agregó 1 µl de ADN resultado de los Minipreps y se incubaron a 37°C por 2 horas. El producto de la digestión se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Finalmente, las clonas que contenían los insertos se enviaron a secuenciar con la compañía MacroGen (Corea).

### **Análisis Bioinformático**

Para todas las secuencias de nucleótidos obtenidas se realizó la búsqueda de la identidad, utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Las secuencias resultantes, fueron editadas y alineadas utilizando el software Bio Edit Sequence alignment Editor. Se buscó el modelo de mejor ajuste para el algoritmo seleccionado de Máxima Verosimilitud (ML) para finalmente elaborar un árbol de homología con Bootstrap de mil réplicas, utilizando el software MEGA 6.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Densidad de Población

*Johngarthia planata* estuvo presente en tres de las cinco zonas de muestreo (Tabla 1): zona 2, zona 3 y zona 4. En la zona 5 (N 27° 58'21"- W 111° 23'02"), el arroyo de Mellink, se encontraron madrigueras que posiblemente estuvieran en uso, pero no hubo ningún avistamiento de cangrejos. En la zona 1 que fue en donde se reportó en 2005 el avistamiento de *J. planata*, no se encontraron cangrejos ni madrigueras en uso. La zona 2 fue donde se encontraron un mayor número de cangrejos. Esto puede deberse a que fue el único sitio con presencia de dos charcas de agua dulce permanentes, una cobertura vegetal mayor y una gran parte con sombra, debida a la presencia de un árbol de Tescalama (*Ficus petiolaris*), que además proporciona la mayor parte de la hojarasca de la zona. La mayor presencia en esta zona es congruente con lo reportado por Ehrhardt (1968), cuando evaluó la densidad de población de *J. planata* en la isla Clipperton, encontrando una densidad muy alta, relacionándola con los cuerpos de agua y la vegetación.

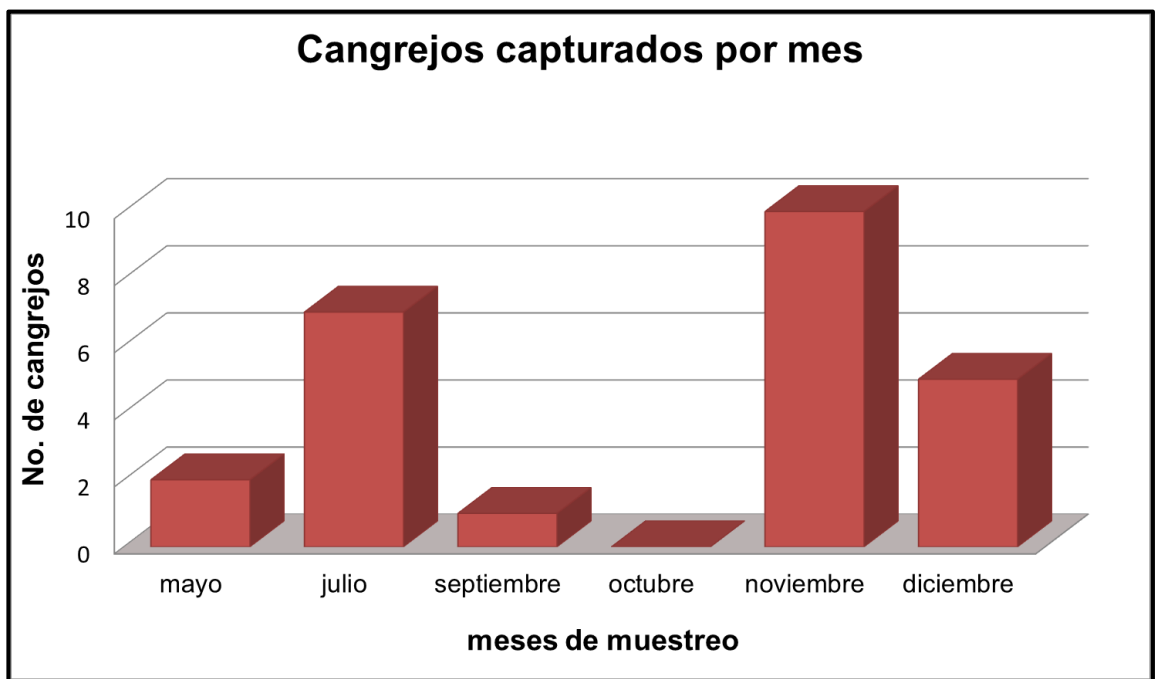
En cuanto a la distribución de los organismos que se marcaron en las tres zonas de la isla, en total se capturaron 21 individuos y se recapturaron cuatro organismos de los anteriormente marcados; 17 de éstos fueron marcados en la zona 2, dos en la zona 3 y dos en la zona 4. Estas diferencias en la distribución de organismos entre las zonas de muestreo, a pesar de las similitudes entre estas, puede estar relacionada con la presencia de vegetación o su ausencia en algunas secciones de las zonas estudiadas ya que la reducción total del follaje puede afectar las características de los microhábitats tales como la humedad del suelo, la disponibilidad de alimentos y el acceso a

los refugios, lo mismo pasa con la presencia de sombra, ya que las zonas sin sombra (zona 1 y zona 5) fueron más secas y con menor presencia de cangrejos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Pérez-Chi (2005), sobre la asociación directa de la densidad de la población de *J. planata* con la vegetación de la localidad (Tabla 1).

Puede observarse que en los meses de julio y noviembre se registraron el mayor número de capturas del cangrejo con 7 y 10 organismos, respectivamente (Figura 4). Esta tendencia en las capturas, pudo estar relacionada con la humedad relativa alcanzada en los meses de muestreo (Figura 5), ya que *J. planata*, al igual que otros cangrejos terrestres, requiere de humedad alta para absorber el oxígeno del aire (Farrelly y Greenaway, 1992). Como se muestra en la Fig. 5, la humedad relativa en los meses de julio y noviembre presentó los valores más altos en el período de evaluación, coincidiendo con los muestreos con mayor número de cangrejos capturados. Una relación similar reportó Pérez-Chi (2005) para la zona interior de la isla Socorro, donde los cambios en la densidad de población estuvieron relacionados con la humedad relativa.

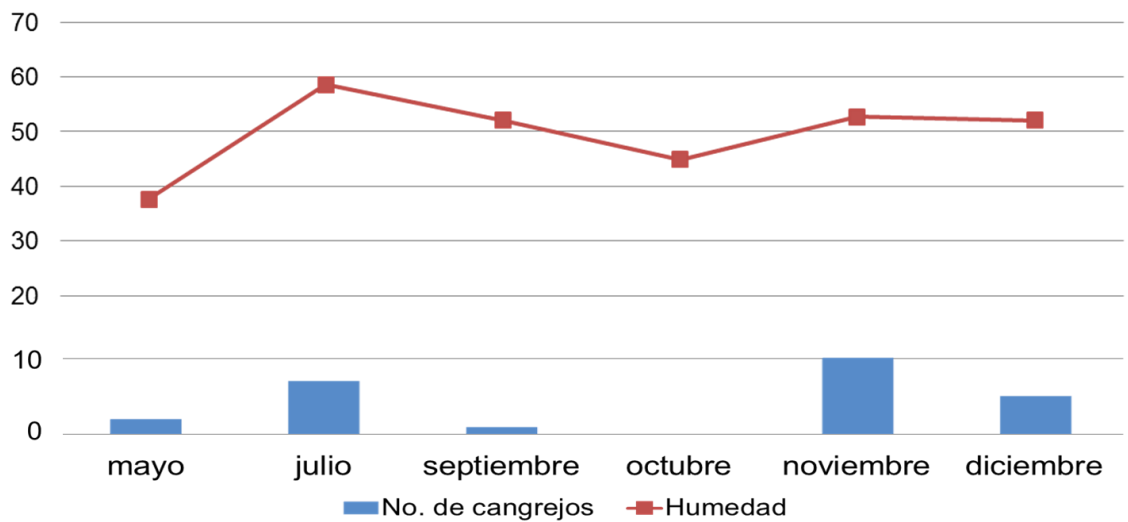
**Tabla 1.** Número de organismos de *Johngarthia planata* encontrados por zona de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.

<b>Nombre de Zonas de la isla</b>	<b>Número de organismos</b>	<b>Recapturas</b>
Ensenada El Farito (Zona 1)	0	0
Lobera de El Farito (Zona2)	17	4
Arroyo de las Guacamayas (Zona 3)	2	0
Arroyo de las Iguanas (Zona 4)	2	0
Arroyo de Mellink (Zona 5)	0	0



**Figura 4.-** Individuos de *Johngarthia planata* encontrados en los meses de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.

## Humedad vs. número de cangrejos



**Figura 5.-** Número de *J. planata* capturados y su relación con la humedad relativa en la zona de muestreo.

La densidad de población de *J. planata* cuantificada en las tres zonas de la isla San Pedro Nolasco, estimada con el índice de Petersen fue de 0.07 individuos/ m<sup>2</sup>, esta densidad es menor a la reportada para la isla Socorro, que fue de 0.12 individuos/m<sup>2</sup> (Jiménez *et al.*, 1994) y mucho más baja que la reportada para la isla Clipperton, que fue de 6 individuos/m<sup>2</sup> (Ehrhardt 1968). Sin embargo es importante mencionar que la isla Socorro es más extensa (140 km<sup>2</sup>) que la Isla San Pedro Nolasco (3.45 km<sup>2</sup>) y cuenta con una abundante vegetación del tipo herbácea, arbustos y árboles, garantizando la alimentación y el refugio para los cangrejos.

Es posible que esta densidad pueda variar ya que no se ingresó a otras zonas con posibilidad de tener poblaciones del cangrejo moro debido a lo accidentado del terreno y a lo inaccesible por la costa en algunas fechas de muestreo.

#### Cuantificación de Madrigueras de *J. planata* en la Isla San Pedro Nolasco.

Durante las visitas a la isla se cuantificaron 37 madrigueras de *J. planata* en las zonas de muestreo (Tabla 2). Todas las madrigueras contabilizadas presentaban señales de actividad reciente de estos cangrejos, como fue tierra recientemente removida o excretas frescas. 25 de estas madrigueras fueron excavadas debajo de raíces de arbustos, en su mayoría de jojoba (*Simondsia chinensis*), y 12 madrigueras fueron grietas bajo rocas con un sustrato suave y húmedo que, de acuerdo a Pérez-Chi (2005), es un tipo de madriguera que el cangrejo moro utiliza en zonas rocosas, aprovechando las grietas que forman las rocas sobre el suelo.

Coincidiendo con la presencia del cangrejo en las zonas evaluadas, la zona 2 fue en la que se contabilizaron mayor número de madrigueras (22). Solamente en la zona 1, no se encontró presencia de madrigueras del cangrejo, a pesar de que en esta zona fue donde se reportó el primer avistamiento de *J. planata* en el 2005. Eso confirma la influencia que tiene la estructura de la vegetación y otras características abióticas presentes en las diferentes zonas de la isla, como son la humedad del suelo, el relieve, el sustrato del suelo y la presencia de cuerpos de agua dulce, como los encontrados en la zona 2, ya que alrededor de estos cuerpos de agua se llegaron a ver simultáneamente a tres cangrejos en sus madrigueras con una cercanía menor a un metro entre ellos.

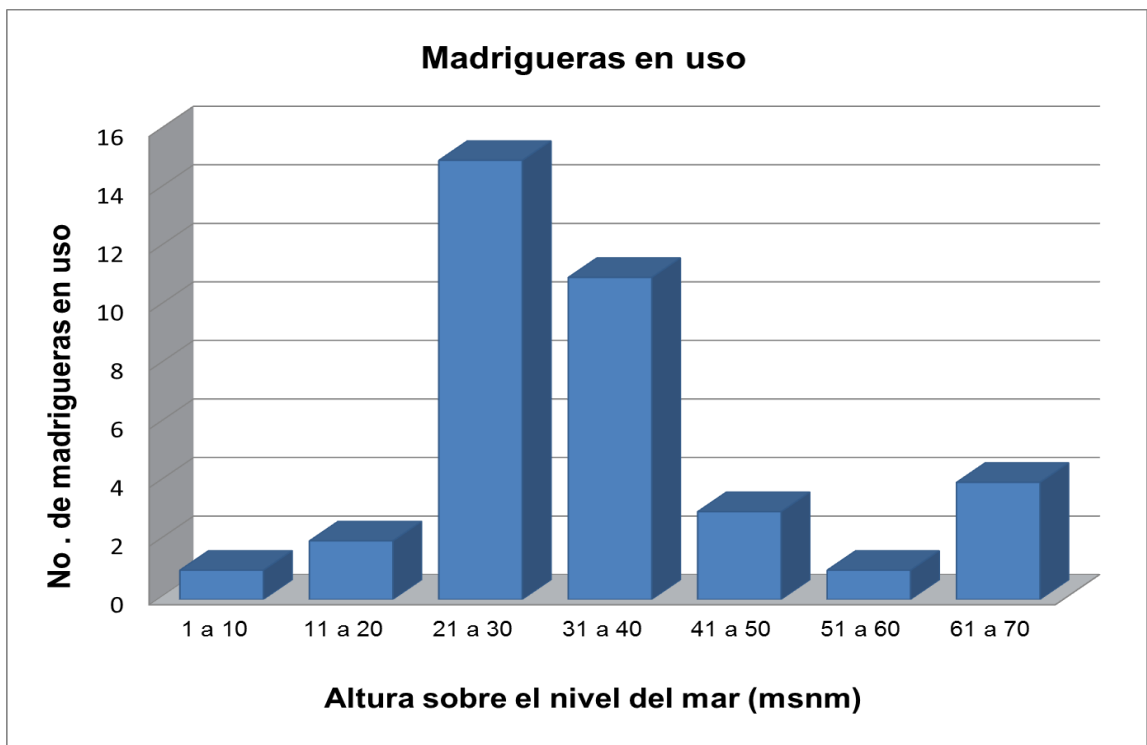
En el caso de las zona 5 se presentaron espacios completamente cubiertos de roca con poca vegetación y no hubo observación de cangrejos. Sin embargo, se cuantificaron 4 madrigueras bajo raíces de arbustos y cuevas con poca humedad en el sustrato.

Los intervalos de altura sobre el nivel del mar en las cuatro zonas donde se encontraron las madrigueras en uso, fueron de 12 a 70 msnm, encontrándose la mayor presencia de madrigueras en niveles de 21-40 msnm (Figura 6). Este resultado coincide con el observado por Pérez-Chi (2005), quien encontró la mayor densidad de cangrejos en zonas con altitudes de 30 msnm. La presencia de las madrigueras coincidieron con la cercanía a las raíces de arbustos de *Perityle californica* y *Simondsia chinensis*.



**Tabla 2.** Número de madrigueras de *Johngarthia planata* encontrados por zona de muestreo en la isla San Pedro Nolasco.

<b>Nombre de Zonas de la isla</b>	<b>Número de Madrigueras</b>	<b>Madrigueras excavadas</b>	<b>Refugios naturales</b>
Ensenada El Farito (Zona 1)	0	0	0
Lobera de El Farito (Zona 2)	22	14	8
Arroyo de las Guacamayas (Zona 3)	3	3	0
Arroyo de las Iguanas (Zona 4)	7	4	3
Arroyo de Mellink (Zona 5)	5	4	1



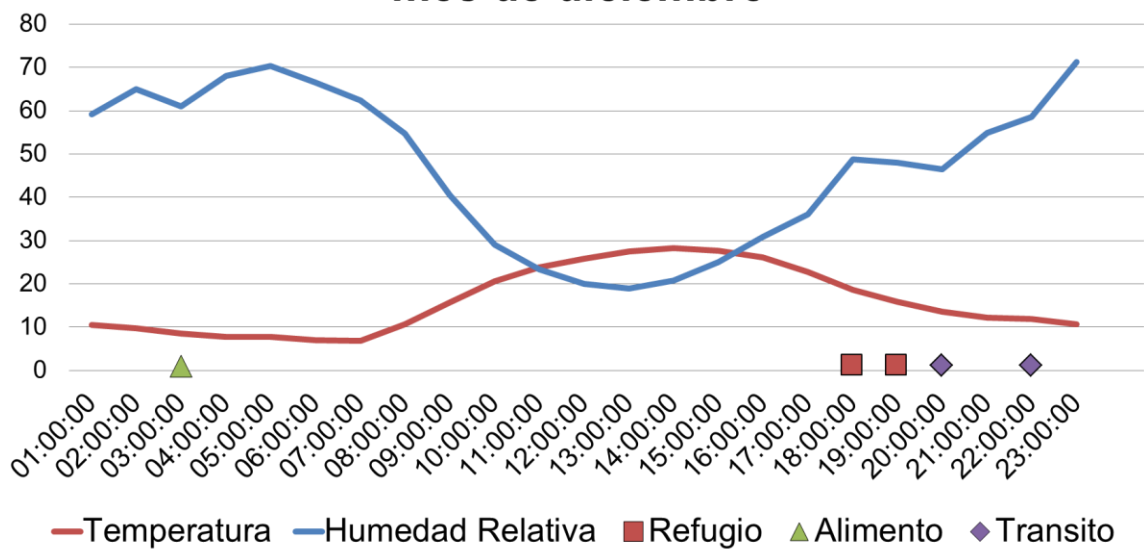
**Figura 6.-** Número de madrigueras y su relación con la altura en msnm en la isla San Pedro Nolasco.

### Actividades de los Cangrejos *J. planata* al Momento de la Captura

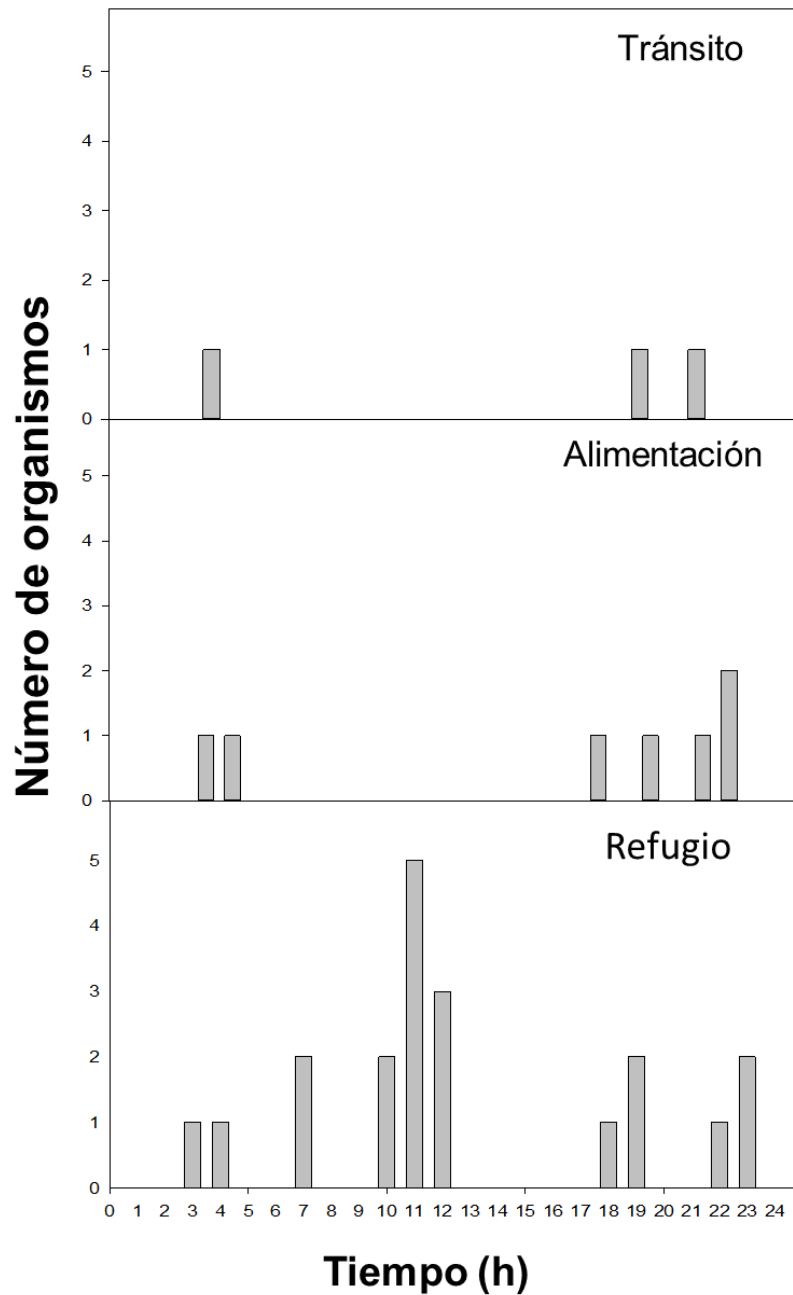
La mayor actividad de los cangrejos al momento de su captura se registró en los intervalos de las 02:00 a 04:00h y de nuevo de 17:00 a 23:00 h, periodo en que se les observó en refugio, alimentándose de hojarasca de jojoba (*S. chinensis*) y de la enredadera (*Vaseyanthus insularis*) o bien transitando por la zona (Figura 7). Felger *et al.* (2011) reportaron a *J. planata* en la isla San Pedro Nolasco alimentándose de *P. californica*, Sin embargo, en este estudio no se observó a los cangrejos alimentándose de esta planta en zonas con *Perityle*. Las madrigueras encontradas debajo de raíces de jojoba y margarita del desierto (*Bahiopsis triangularis*), indican que la raíz de estos arbustos proporcionan buenos refugios.

Se pudo observar a los cangrejos moros refugiados en sus madrigueras durante todo el día, pero con un mayor número de organismos refugiados durante el intervalo de 07:00 a 12:00 h (Figura 8), que son las horas de intenso sol y de temperaturas muy elevadas en la isla, factores que pueden estar influyendo en que no se encontraran organismos en tránsito o alimentándose en ese período de tiempo. La permanencia en los refugios en las horas del día permite a los cangrejos minimizar la pérdida de agua (Lindquist *et al.*, 2009). Estas observaciones coinciden con las realizadas por Perger *et al.* (2013), quienes reportan que durante el día encontraron a *J. planata* en madriguera solamente en las islas Nairita y Caño en Costa Rica.

### Actividades de *J. planata* en muestreo del mes de diciembre



**Figura 7.-** Actividades realizadas por *J. planata* durante un día completo de muestreo en el mes de diciembre 2013.



**Figura 8.-** Actividad realizada por *J. planata* al momento de la captura en la isla San Pedro Nolasco por hora del día.

## Estudio de Variación Genética de *J. planata*.

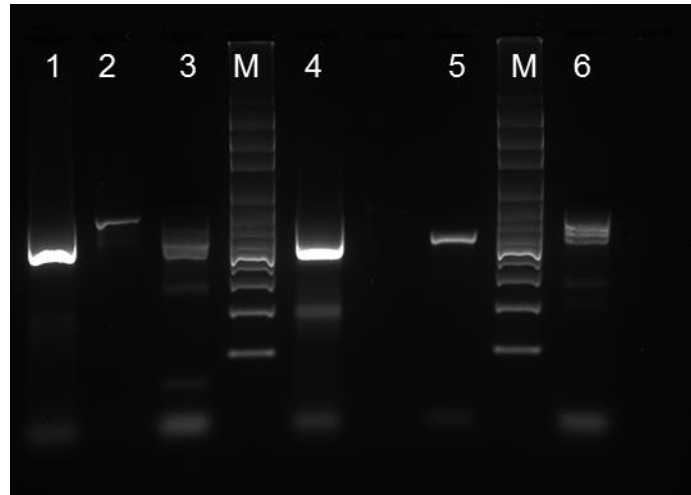
Se extrajo el ADN genómico total de las muestras recolectadas en la isla San Pedro Nolasco y las obtenidas de las muestras de colecciones. Las bandas amplificadas mediante PCR fueron de aproximadamente 500 pb (Figura 9). Los fragmentos se cortaron y se clonaron. Los clones recombinantes se digirieron mediante con EcoRI, observándose los productos de aproximadamente 500 pb (Figura 10).

Se obtuvieron 43 clonas recombinantes, las cuales se enviaron a secuenciar, de estos, para el gen 18S, 13 fueron de *Johngarthia planata* y 8 de *Gecarcinus quadratus* (Tabla 3), mientras que del gen 16S se enviaron 12 de *J. planata* y 10 de *G. quadratus* (Tabla 4). De los 43 productos enviados, se secuenciaron con éxito 22. Estas secuencias fueron utilizadas en el análisis filogenético; es importante aclarar que las muestras de Jalisco y Mazatlán estuvieron preservadas por muchos años en formol y posteriormente trasferidas a etanol, por lo que la calidad del ADN no era óptima, por esta razón no todos los fragmentos enviados pudieron ser secuenciados con éxito.

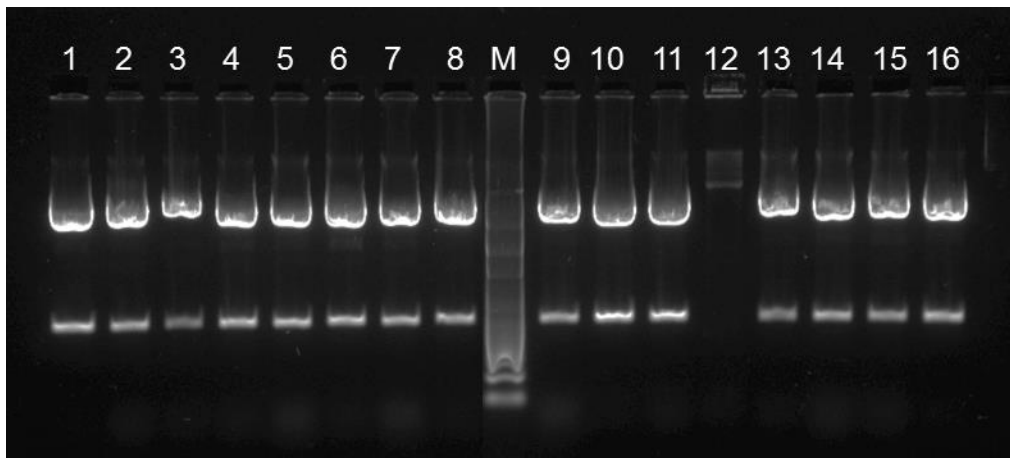
Debido a que las secuencias obtenidas eran muy similares, se resumieron a tres coincidencias mediante el resultado del análisis BLAST del gen 16S (Tabla 5). El resultado del BLAST de las secuencias del gen 18S, al igual que para el del 16S, se resumió en tres coincidencias (Tabla 6). Los resultados muestran una alta similitud entre los cangrejos terrestres utilizando el gen 16S. En cambio, el gen 18S mostró similitud a cangrejos en general. Para la construcción de los árboles filogenéticos, se analizaron un total de 13 secuencias del gen 16S: seis de *J. planata*, seis de *G. quadratus* y una de *P. monodon*, como grupo externo. La matriz final consistió en 584 posiciones,

de las cuales, 376 son conservados y 202 variables, de estos, 152 posiciones son de variación única (singleton) y sólo 50 posiciones se consideraron como parsimoniosamente informativos.

Algo muy similar sucede en el caso del gen 18S, la matriz final constó de 11 secuencias: cinco de *J. planata*, cinco de *G. quadratus* y *P. monodon* como grupo externo. Se analizaron un total de 488 caracteres, de los cuales, 414 son caracteres conservados 54 eran variables, de los cuales 53 eran sitios de variación única (Singleton) y sólo un sitio se consideró parsimoniosamente informativo. Sin contar al grupo externo, las secuencias son en extremo conservadas, dado la naturaleza del marcador molecular.



**Figura 9.-** Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando amplificaciones de 16S mediante PCR. M: Marcador de peso molecular Ladder (100 pb – 3000 pb) Carriles 1, 2, 3 y 4 *Johngarthia planata*, 5 y 6 *Gecarcinus Quadratus*, muestras de Guaymas, Sonora.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando digestiones de clones recombinantes digeridos con la enzima *EcoRI*. M Marcador de peso molecular Ladder (100 pb – 3000 pb), Carriles 1-8 clones recombinantes de *J. planata*, carriles 9-16 clones recombinantes de *G. quadratus*.



**Tabla 3.-** Claves de secuenciación de las muestras enviadas de *J. planata* y *G. quadratus* del gen 18S. Sombreado en gris las muestras que se pudieron secuenciar.

Nombre	Lugar de captura	Gen	Clave de secuenciación
<i>Johngarthia planatus</i>	Guaymas	18 S	PG 118
			PG 218
			PG 318
			PG 418
			PG 518
	Mazatlán	18 S	PM 118
			PM 218
			PM 318
			PM 418
			PM 518
	Jalisco	18 S	PJ 118
			PJ 218
PJ 318			
<i>Gecarcinus quadratus</i>	Guaymas	18 S	QG 118
			QG 218
			QG 318
			QG 418
			QG 518
	Mazatlán	18 S	QM 118
			QM 218
			QM 318

**Tabla 4.-** Claves de secuenciación de las muestras enviadas de *J. planata* y

*G. quadratus* del gen 16S. Sombreado en gris las muestras que se pudieron secuenciar.

Nombre	Lugar de captura	Gen	Clave de secuenciación
<i>Johngarthia planatus</i>	Guaymas	16 S	PG 116
			PG 216
			PG 316
			PG 416
			PG 516
	Mazatlán	16 S	PM 116
			PM 216
			PM 316
	Jalisco	16 S	PJ 116
			PJ 216
			PJ 316
			PJ 416
<i>Gecarcinus quadratus</i>	Guaymas	16 S	QG 116
			QG 216
			QG 316
			QG 416
			QG516
	Mazatlán	16 S	QM 116
			QM 216
			QM 316
			QM 416
			QM 516

**Tabla 5.-** Análisis de similitud con las secuencias 16S de *J. planata* y *G. quadratus* en las bases de datos del GenBank del NCBI.

<b>Etiqueta</b>	<b>Especie / Secuenciación</b>	<b>% Identidad</b>
PG116	<i>Gecarcinus lateralis</i> partial mitochondrial 16S rRNA gene	96%
	<i>Gecarcoidea lalandii</i> mitochondrial partial 16S rRNA gene, specimen voucher ZRC 1998.423	94%
	<i>Hemigrapsus crenulatus</i> mitochondrial gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	91%
QG116	<i>Cardisoma armatum</i> mitochondrial partial 16S rRNA gene, isolate JAC4	98%
	<i>Cardisoma armatum</i> mitochondrial partial 16S rRNA gene, isolate SG2	97%
	<i>Cardisoma crassum</i> partial mitochondrial 16S rRNA gene, isolate CR1	97%

**Tabla 6.-** Análisis de similitud con las secuencias 18S de *J. planata* y *G. quadratus* de las bases de datos del GenBank del NCBI

<b>Etiqueta</b>	<b>Especie / Secuenciación</b>	<b>% Identidad</b>
PG118	<i>Pachygrapsus marmoratus</i> voucher KCpama 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	<i>Acantholobulus bermudensis</i> voucher ULLZ 6924 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	<i>Eriocheir sinensis</i> 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%
QG118	<i>Cyclograpsus cinereus</i> isolate KC3417 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	<i>Gaetice depressus</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
	<i>Platyxanthus orbigny</i> voucher ULLZ 11714 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%

Del análisis filogenético molecular del gen 18S (Figura 11) se dedujo la historia evolutiva utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor (1969). Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alto (-879.1288). El porcentaje de árboles en el que se muestran los taxa asociados en grupos junto a las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo de forma automática mediante la aplicación de Neighbor-Joining y algoritmos BioNJ a una matriz de distancias por pares utilizando el método de máxima verosimilitud (MCL), y luego seleccionar la topología con valor de probabilidad log superior. El árbol se presenta a escala, con longitudes de las ramas medido en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó a 11 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen espacios vacíos (gaps) y los datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 467 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó en MEGA6 (2013).

En el árbol filogenético del gen 18S se puede observar como un gen muy conservado, pero que separa los clados por género.

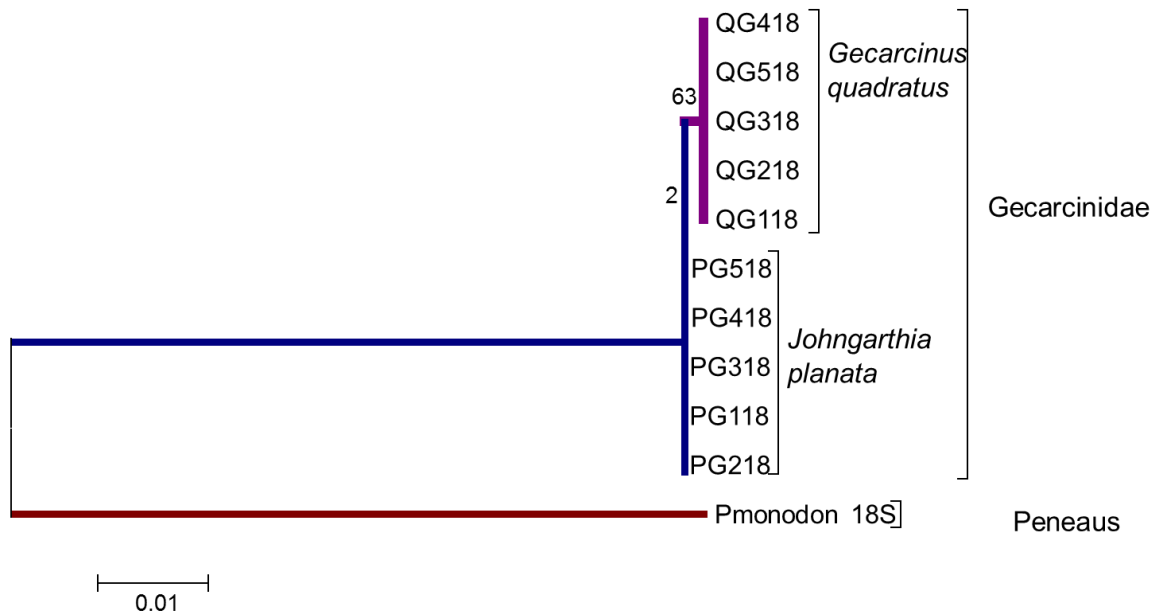


Figura 11.- Árbol filogenético del fragmento de gen 18S de las especies *Johngarthia planata* y *Gecarcinus quadratus* de Guaymas, Sonora. En morado *Gecarcinus quadratus* de Guaymas. En azul *Johngarthia planata* de Guaymas. En rojo como grupo externo *Peneaus monodon*.

Del análisis filogenético molecular del gen 16S (Figura 12), se dedujo la historia evolutiva utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Hasegawa-Kishino-Yano (1985). Se muestra el árbol con la más alta probabilidad de registro (-1477.4371). El porcentaje de árboles en el que se muestran los taxa asociados agrupados junto a las ramas. Árbol inicial (s) para la búsqueda heurística se obtiene aplicando el método de agrupamiento de vecinos a una matriz de distancias por parejas estimadas usando el método de máxima verosimilitud (MCL). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medida en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó a 13 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones con la cobertura del sitio de menos de 95% fueron eliminados. Es decir, menos del 5% de gaps en la alineación, los datos que faltan, y las bases ambiguas fueron permitidas en cualquier posición. Hubo un total de 558 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó en MEGA 6 (2013).

El árbol filogenético del gen 16S tuvo una mayor resolución por ser un gen mitocondrial, este muestra dos clados que son uno de *G. quadratus* de Guaymas y otro que muestra a *J. planata* de Guaymas, Jalisco y una muestra de *G. quadratus* de Mazatlán. Esta última pudo haber tenido un error de etiquetado y ser efectivamente *J. planata* de Mazatlán, ya que la secuencia solo tuvo una base de diferencia y el modelo lo agrupa dentro de este clado.

De estos resultados podemos deducir que los organismos recolectados en la isla San Pedro Nolasco, pertenecen al mismo clado que los organismos de Jalisco y que resultó diferente en 21% al de Mazatlán.

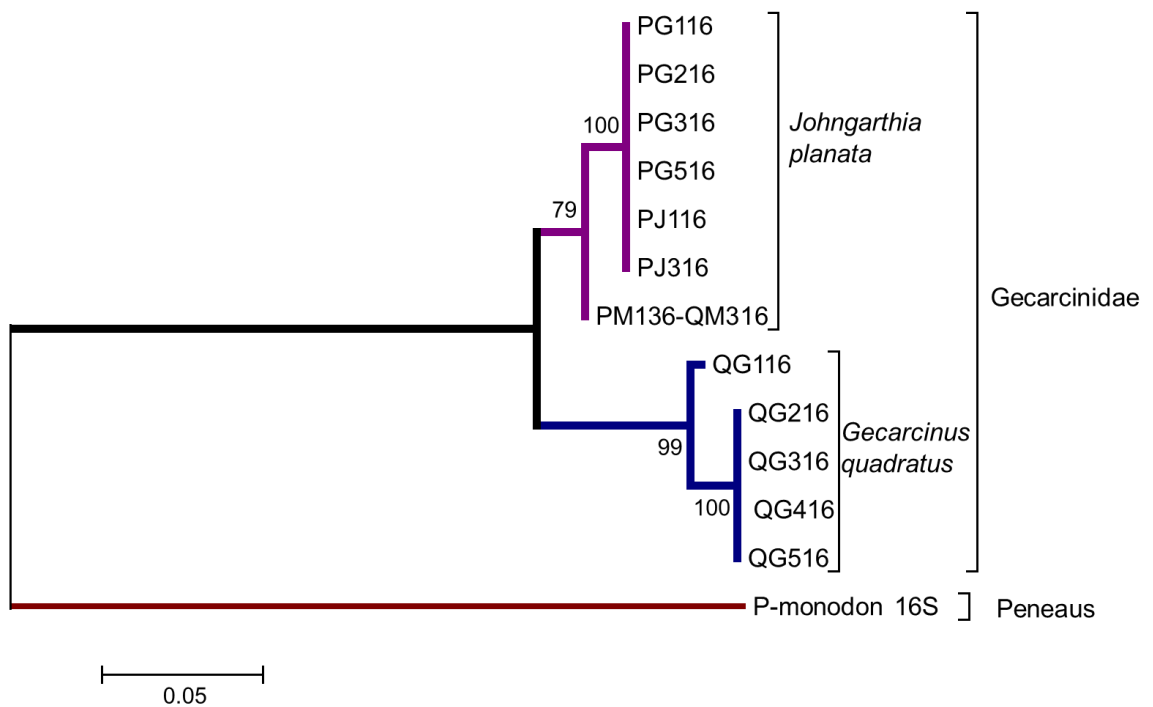


Figura 12.- Árbol filogenético de fragmento de gen 16S de las especies *J. planata* y *G. quadratus* de diferentes localidades. En color morado *Johngarthia planata*, PG (*J. planata* de Guaymas), PJ (*J. planata* de Jalisco) y PM (*J. planata* de Mazatlán). De color azul *Gecarcinus quadratus*, QG (*G. quadratus* de Guaymas). En color rojo el grupo externo de *Peneaus monodon*.



Los estudios de filogenia de cangrejos de las super familias Grapsoidea y Ocypodoidea, han causado discusión sobre la clasificación de algunas familias tal es el caso de Dotillinae y Camptandriidae con Sesarmidae y Gecarcinidae, que son buenas demostraciones de que el actual sistema taxonómico no parece reflejar las relaciones naturales y puede dificultar el examen imparcial de unidades evolutivas en futuras clasificaciones taxonómicas (Schubart *et al.*, 1999; Kitaura *et al.*, 2002; Schubart *et al.*, 2006).

Estudios filogenéticos utilizando DNA mitocondrial en crustáceos se han realizado con los marcadores de 16S rRNA (Sun *et al.*, 2003), en ocasiones los han complementado, como el caso de Reuschely Schubart (2006) con fragmentos de citocromo oxidasa subunidad I (COI), donde encontraron diferencias entre poblaciones distantes de *Xantho hydrophilus*.

Actualmente, los genes mitocondriales son considerados código de barras en la filogenia de animales (Vilgalys y Hester, 1990). Para el Gen 16S tiene un porcentaje de variabilidad del 4,53 % para poder atribuirse a la variación entre poblaciones dentro de grupos (Imsiridou *et al.*, 2012), por lo que se pudieran reforzar los resultados complementando utilizando como complemento marcadores de la región control (D-loop), que es la región no codificante de mayor tamaño, ocupa 1122 pares de bases y se sitúa entre el gen que codifica para el RNA de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina. La región control destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes (Vigilant *et al.*, 1991) y por su elevada variabilidad intrapoblacional.

Un buen marcador molecular debe cumplir con las siguientes características: ser relativamente corto (~1000 pb), ser fácilmente amplificable (esto implica que de preferencia exista más de una copia en el genoma), y poseer variabilidad

suficiente para el nivel taxonómico deseado. Existen por lo tanto, otros genes que pueden ser utilizados para la filogenia de animales, tal es el caso de los genes ribosomales, tales como los espaciadores transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés). Hideyuki *et al.* (2004), utilizaron el fragmento ITS1 en complementación con el gen mitocondrial 16S. Actualmente los genes ribosomales se han utilizado para clasificar diferentes organismos (Maddison *et al.*, 2007).

Otras técnicas de marcaje molecular se han utilizado para coadyuvar en el conocimiento filogenético de organismos, como es el caso de los AFLP / RFPL (Hideyuki *et al.*, 2004, Varshney *et al.*, 2009), estos métodos tienen la ventaja de obtener mayor polimorfismo utilizando ADNg total. Sin duda alguna, el estudio filogenético de los organismos debe basarse en genomas completos. Aunque se han secuenciado genomas completos de varios invertebrados, en el caso de crustáceos, únicamente se conoce el de la pulga marina *Daphnia pulex* (Colbourne *et al.*, 2012), por lo que el conocimiento genómico y filogenético de este grupo es muy escaso.

## CONCLUSIONES

- *Johngarthia planata* estuvo presente en tres de las cinco zonas de muestreo: Zona 2 (Lobera el Farito), Zona 3 (Arroyo de las Guacamayas) y Zona 4 (Arroyo de las Iguanas). En total se capturaron 21 individuos y se recapturaron cuatro organismos de los anteriormente marcados.
- En los meses de julio y noviembre se registraron el mayor número de capturas del cangrejo con 7 y 10 organismos, respectivamente.
- La densidad de población de *J. planata* cuantificada en las tres zonas de la isla San Pedro Nolasco, estimada con el índice de Petersen fue de 0.07 individuos/ m<sup>2</sup>. Encontrándose la mayor densidad de cangrejos en zonas con altitudes de 30 msnm.
- Se cuantificaron 37 madrigueras de *J. planata* y estas fueron encontradas en los rangos de altura de 12 a 70 msnm, encontrándose la mayor presencia de madrigueras en niveles de 21-40 metros de altura.
- La mayor actividad de los cangrejos al momento de su captura se registró en los rangos de las 02:00 a 04:00h y de nuevo de 17:00 a 23:00 h, periodo en que se les observó en refugio, alimentándose o bien transitando por la zona.

- En el árbol filogenético del gen nuclear 18S muestra ser un gen muy conservado, que separa los clados de los géneros *Johngarthia* de *Gecarcinus*.
- El árbol filogenético del gen 16S tuvo una mayor resolución, este muestra dos clados que son uno de *G. quadratus* de Guaymas y otro que muestra a *J. planata* de Guaymas, Jalisco y una muestra de *G. quadratus* de Mazatlán. Aunque no separa las poblaciones de *J. planata* de Guaymas y Jalisco, la población de Mazatlán si la separa.

## RECOMENDACIONES

Para mejorar los censos de cangrejos terrestres es importante el tener un mayor equipo de búsqueda que abarque todas las zonas en el mismo rango de tiempo, ya que un equipo de una o dos personas no es suficiente.

Se requiere un mayor número de estudios de variación genética, no solo para *Johngarthia planata*, sino para el resto de los cangrejos terrestres y surge la necesidad de evaluar otras regiones del genoma y otras regiones ribosomales, o bien, otros marcadores moleculares de estos crustáceos para mejor entender sus relaciones evolutivas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arif, I. A., Khan, H. A. 2009. Molecular markers of biodiversity analysis of wildliffw animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32:9-17.
- Atkinson, I. 1985. The spread of commensal species of *Rattus* to oceanic islands and their effects on island avifaunas. *Conservation of Island Birds*, pp. 35-81. Moors P.J., Ed., Cambridge, International Council for Bird Preservation Technical Publication No. 3.
- Bailey, N. T. 1952. Improvements in the interpretation of recaptured data. *Anim. Ecol.* 21:120-127.
- Balss, H. 1957. Decapoda VIII: Systematik. Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Crustacea (BronnH. G. Ed.), Bd. 5. Abt. 1, 7(12) pp. 1505–1672.
- Bouchard, J.M. y Poupin J. 2009. – Éléments d' écologie et nouveau recensement de la population du crabeterrestre *Gecarcinus planatus* Stimpson, 1860 (Decapoda: Brachyura). En: Charpy, L. (Coord.), Clipperton: environnement et biodiversité d'un microcosmeocéanique. IRD, Marseille, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Patrimoines Naturels, 420 pp., 68: 333-346.
- Brawley, S. H. 1992. Mesoherbivores. En: D.M John, S.J. Hawkins y J.H. Price (eds.) *Plant- animal interaction in the marine benthos*. Clarendon, Oxford. Pp. 235-263.

- Bright, H.B. y Hogue C. L. 1972. A synopsis of the burrowing land crabs of the world and list of their arthropod symbionts and burrow associates. *Contribution to Science*. 220:1-58.
- Brusca, R.C. y Brusca, G.J. 2002. *Invertebrates*. 2da Edición. SinauerAssociates, Inc., E.U.A., pp. 475-477.
- Brusca, R.C., y W. Moore. 2003. *Seashore Guide to the Northern Gulf of California*. Arizona-Sonora Desert Museum Press, Tucson, AZ. 203 pp.
- Burggren, W.W. 1998. *Biology of land crabs*. Cambridge University Press, New York, pp. 479.
- Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., Gilbert, D., Thomas, W.K., Tucker, A., Oakley, T.H., Tokishita, S., Aerts, A., Arnold, G.J., Basu, M.K., Bauer, D.J., Cáceres, C.E., Carmel, L., Casola, C., Choi, J.H., Detter, J.C., Dong, Q., Dusheyko, S., Eads, B.D., Fröhlich, T., Geiler-Samerotte, K.A., Gerlach, D., Hatcher, P., Jogdeo, S., Krijgsveld, J., Kriventseva, E.V., Kültz, D., Laforsch, C., Lindquist, E., Lopez, J., Manak, J.R., Muller, J., Pangilinan, J., Patwardhan, R.P., Pitluck, S., Pritham, E.J., Rechtsteiner, A., Rho, M., Rogozin, I.B., Sakarya, O., Salamov, A., Schaack, S., Shapiro, H., Shiga, Y., Skalitzky, C., Smith, Z., Souvorov, A., Sung, W., Tang, Z., Tsuchiya, D., Tu, H., Vos, H., Wang, M., Wolf, Y.I., Yamagata, H., Yamada, T., Ye, Y., Shaw, J.R., Andrews, J., Crease, T.J., Tang, H., Lucas, S.M., Robertson, H.M., Bork, P., Koonin, E.V., Zdobnov, E.M., Grigoriev, I.V., Lynch, M. y Boore, J.L. *Science*. 331: 555–561.

- Cuesta, J.A, García-Guerrero M.U, y Hendrickx. M.E. 2007. The complete larval development of *Johngarthiaplanatus* (Brachyura: Grapsoidea: Gecarcinidae) described from laboratory reared material with notes on the affinity of *Gecarcinus* and *Johngarthia*. *Journal of Crustacean Biology* 27 (2): 263-277. *Journal of Crustacean Biology*, 27(2): 263–277.
- Cuesta, J.A., Schubart C.D y Rodríguez A., 2000. Larval development of *Brachynotussexdentatus* (Risso, 1827) (Decapoda, Brachyura) reared under laboratory conditions, with notes on larval characters of the Varunidae. *Invertebrate Reproduction and Development* 38(3): 207-223
- Delfosse, B. 1990. The effect of the red land crab, *Gecarcinuslateralis*, on the litter layer, nutrient availability and seedling recruitment in a semi-deciduous seasonal dry tropical forest. M.Sc. thesis. York University, Toronto. pp.199
- Ehrhardt, J. P. 1968. Recensement en 1968 de la population de *Gecarcinusplanatus* Stimpson sur l'atoll de Clipperton. Rapport particulier du Centre de Recherches du Service de Sante des Armees (C.R.S.S.A.), Division de Biologie Générale et Ecologie (Biology and Ecology.), Paris 40: 1-9.
- Ewald, M. 2006. Isolation and characterization of nuclear and mitochondrial genetic markers of population studies of *Ucidescordatuscordatus* (Decapoda: Brachyura). (Dissertation of Doctor of Natural Sciences). Bremen, Germany: University of Bremen.

- Farrelly, C.A. y Greenaway, P. 1992. Morphology and ultrastructure of the gills of terrestrial crabs (Crustacea, Gecarcinidae and Grapsidae): Adaptations for air-breathing. *Zoomorphology*, 112: 39-49.
- Felger, B.T., Wilder B.T. y Gallo-Reynoso J.P. 2011. Floristic diversity and long-term vegetation dynamics of Isla San Pedro Nolasco, Gulf of California, Mexico. *Proceedings of the San Diego Society of Natural History* 43:1–42.
- García-Franco, J. Rico-Gray, V y Zayas, O. 1991. Seed and seedling predation of *Bromeliapenquin* L. by the red land crab *Gecarcinuslateralis*Frem. InVeracruz, Mexico. *Biotropica* 23:96–97.
- Griffiths, ME, Mohammad, BA, Vega, A. (2007) Dry season distribution of land crabs, *Gecarcinusquadratus* (Crustacea: Gecarcinidae), in Corcovado National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 55: 219-224.
- Hartnoll, R.G. 1988. Evolution, systematics, and geographical distribution. In *Biology of the land crabs*, ed W. W. Burggren y B. R. McMahon (Eds.). New York: Cambridge University Press. pp. 6-54
- Hendrickx, M.E., Brusca R.C., y Ramírez-Reséndiz, G. 2002. Biodiversity of macrocrustaceans in the Gulf of California, Mexico. pp. 349-368. En. *Contributions to the Study of East Pacific Crustaceans*. [Contribuciones al Estudio de los Crustáceos del Pacífico Este.] M. E. Hendrickx, ed. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Pp. 383.



- Hendrickx, M.E. 2005. Cap. 14. Crustacea 6. Decapoda: Dendrobranchiata, Caridea, Palinura, Anomura & Brachyura. pp. 159-194. En: Listado y Distribución de la Macrofauna del Golfo de California, México, Parte I. Invertebrados. Hendrickx, M. E., R. C. Brusca and L. T. Findley (eds.) Arizona-Sonora Desert Museum. Pp. 429.
- Hendrickx M.E. 1995. In Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E. y Niem, V.H. (Eds). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados. Roma, FAO. 1995 Vol. I.
- Hideyuki, I., Cheng, J.H., Hamasaki, K. & Numachi, K.I. 2004. Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16S rDNA markers. *Aquatic Living Resources*. 17: 31-34.
- Imsiridou, A., Karaiskou, N., Aggelidou, E., Katsaresand, V. y Galinou – Mitsoudi, S. 2012. Mitochondrial DNA variation as a tool for systematic status clarification of commercial species. The case of two high commercial *Flexopecten* forms in the Aegean Sea. In: *Aquaculture*. Muchlisin Z. (ed.), pp. 109-126. Intech Open Access Publisher, Croatia.
- INE (Instituto Nacional de Ecología) 1994. Programa de manejo de la Reserva Especial de la Biosfera Islas del Golfo de California. SEDESOL, México.

- Jiménez, C. A. Ortega, Álvarez, S. y Arnaud, G. 1994. Ecological aspects of the land crab *Gecarcinus planatus* (Decapoda: Gecarcinidae) in Socorro Island, México. *Biol. Conserv.*, 69:9-13.
- Kitaura, J., Wada, K. y Nishida, M. 2002. Molecular phylogeny of grapsoid and ocyrodoid crabs with special reference to the genera *Metaplex* and *Macrophthalmus*. *Journal of Crustacean Biology*. 22:682-693.
- Lindquist, E.S., Krauss K.W., Green P.T., O'Dowd D.J., Sherman P.M. y Smith T.J. 2009. Land crabs as key drivers in tropical coastal forest recruitment. *Biological Reviews* 84: 203-223. DOI: 10.1111/j.1469-185x.2008.00070.x.
- Maddison, D. R., Schulz, K. S., & Maddison, W. P. 2007. The tree of life web project. *Zootaxa*, 1668(Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy),pp. 19-40.
- Manrique, F.A. 1981. Two new records for land crabs in the Gulf of California (Brachyura: Gecarcinidae). *Crustaceana*. 41: 216-217.
- Ortega-Rubio, A., Jiménez, M. L., Llinas, J. y Arnaud, G. 1997. Some ecological aspects of the land crab *Gecarcinus planatus* Stimpson, at Socorro Island, Colima, México. *Journal of de Arizona Nevada- Academy of Science*, 30 : 17-22.

- Pascual, M., García-Merchán V. H., Robainas-Barcía A., Palero F., Rufino M., Calabria G., Ordóñez V., Schunter C., Balanyà J., Mestres F., Macpherson E. y Abelló P. 2012. Análisis genético y morfométrico en el cangrejo *Liocarcinus depurator* en la transición Atlanto-Mediterránea [Resumén]. In: XIX Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución, Orduña, 2-4, pp. 38.
- Paulay, G. y Starmer, J. 2011. Evolution, Insular Restriction, and Extinction of Oceanic Land Crabs, Exemplified by the Loss of an Endemic *Geograpsus* in the Hawaiian Islands. *Public Library of Science*.6(5). e19916. doi:10.1371/journal.pone.0019916.
- Perger, R., Cortes, J. y Pacheco, C. 2013. Closing a distributional gap of over 3000 km and encountering an invisible barrier: new presence/absence data for *Johngarthiaplanata* Stimpson, 1860 (Decapoda, Brachyura, Gecarcinidae) for Central America and biogeographic notes on East Pacific Gecarcinidae. *Crustaceana*. 2013;86(3):268–277. doi: 10.1163/15685403-00003172.
- Pérez-Chi, A. 2005. Densities, Diel Activity, Burrow Shape, and Habitat Characteristics of *Gecarcinus (Johngarthia) planatus* Stimpson, 1860 (Decapoda, Brachyura, Gecarcinidae) at Socorro Island, Revillagigedo, Mexico. *Crustaceana* 78: 255-272.
- Peter, T., Green, P.T., O'Dowd, D. y Lake P.S. 1997. Control of seedling recruitment by land crabs in rain forest on a remote oceanic island. *Ecology* 78: 2474-2486.

- Peter, K. L. Ng, Guinot, D. y Peter J. F. D. 2008. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant Brachyuran crabs of the world. Raffles Bulletin of Zoology 17: 1-286.
- Schubart, C.D., Cuesta, J.A., Diesel, R. y Felder D.L. 1999. Molecular Phylogeny, Taxonomy, and Evolution of Nonmarine Lineages within the American Grapsoid Crabs (Crustacea: Brachyura). Molecular Phylogenetics and Evolution 15: 179–190.
- SEMARNAT y Comité Asesor Nacional sobre el Territorio Insular Mexicano. 2012. Estrategia Nacional para la Conservación y el Desarrollo Sustentable del Territorio Insular Mexicano. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Secretaría de Gobernación, Secretaría de Marina-Armada de México y Grupo de Ecología y Conservación de Islas, A.C. México, D.F. y Ensenada, B.C. pp. 125.
- Sherman, P.M. 2002. Effects of land crabs on seedling densities and distributions in a mainland neotropical rain forest. Journal of Tropical Ecology. 18:67–89.
- Shih, C. H., Haung H. L., Chu T. J., Lee Y. C., Wang C.M. y Tzeng T. D. 2011. Genetic diversity and historical demography of Kumirashrimp (*Penaeus japonicas*) species complex of China based on mitochondrial DNA analysis. African journal of Biotechnology. Vol. 10.: 1065-1072.

- Schubart, C.D., Neigel J.E., Felder, D.L. 2000. The use of mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustacean Issues* 12: 817-830.
- Schubart, C.D., Cannicci, S., Vannini, M. y Fratini, S. 2006. Molecular phylogeny of grapsoid crabs (Decapoda, Brachyura) and allies based on two mitochondrial genes and a proposal for refraining from current superfamily classification. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44:193-199.
- Solís-Ramos, L. Y., y Andrade-Torres,A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? *La Ciencia y El Hombre*. Ene-Abril. XVIII (1): 41-46. ISSN: 0187-8786. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32:9 - 17.
- Sun, H.Y., Zhou, K. y Yang, X.J. 2003. Phylogenetic relationships of the mitten crabs inferred from mitochondrial 16S rDNA partial sequences (Crustacean, Decapoda). *ActaZoologicaSinica*. 49:592-599.
- Tershy, B. R., Breese D., y Croll D. A. 1997. Human perturbations and conservation strategies for San Pedro Mártir Island, Islas delGolfo de California Reserve, México. *Environmental Conservation*, 24(03): 261-270.
- Varshney, R. K., Nayak, S. N., May, G. D., y Jackson, S. A. 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in biotechnology*, 27(9), 522-530.

- Vermeij, G.J. y Dudley, R. 2000. Why are there so few evolutionary transitions between aquatic and terrestrial ecosystems. *Biological Journal of the Linnean Society*. 70: 541–554.
- Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K., y Wilson, A. C. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253(5027), 1503-1507.
- Vilgalys, R. y Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238-4246.
- Walter, H. S. y Levin, G. A. 2008. Feral sheep on Socorro Island: facilitators of alien plant colonization and ecosystem decay. *Diversity and Distributions*. 14: 422–431.
- Wolcott, T. G. 1988. Ecology. In *Biology of the land crabs*, W. W. Burggren y B. R. McMahon. Cambridge University Press, 55-96.
- Zavala-Gonzalez, A. y Mellink-Bijtel, E. 2000. Historical exploitation of the California Sea Lion, *Zalophus californianus*, in México. *Marine Fisheries Review*. 62: 35-40 .