



NOTA / NOTE

Gen Citocromo Oxidasa I confirma la presencia del nemertino *Carcinonemertes conanobrieni*, parásito de la langosta espinosa del Caribe (*Panulirus argus*) en Colombia

The Cytochrome Oxidase I gene confirms the presence of the nemertine *Carcinonemertes conanobrieni*, a parasite of the Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus*) in Colombia

Amanda Berben^{1*}, Jaime Gonzalez-Cueto¹, Angie Colorado¹ y Sigmer Quiroga^{1,2}
ID 0000-0002-8005-1689 ID 0000-0003-1567-0296 ID 0000-0002-5883-9197 ID 0000-0002-3321-1360

1. Grupo de Investigación MIKU, Universidad del Magdalena, Carrera 32 # 22-08, Santa Marta DTHC, Colombia. amyberbenhenriquez23@gmail.com*, biojaime14@gmail.com, angi.colorado@gmail.com

2. Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología, Universidad del Magdalena, carrera 32 # 22-08, Santa Marta DTHC, Colombia. sigmerquiroga@unimagdalena.edu.co

* Autor de correspondencia.

RESUMEN

Las identificaciones morfológicas, complementadas con análisis moleculares son importantes para la delimitación de especies crípticas. Este documento contiene anotaciones sobre la identificación molecular del nemertino parásito *Carcinonemertes conanobrieni* en langostas espinosas del Caribe *Panulirus argus*. Los nemertinos recolectados se encontraron parasitando langostas ovadas del golfo de Salamanca (Puebloviejo), Colombia. Se extrajo ADN de un individuo y se amplificó un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) utilizando los *primers* universales de Folmer, la secuencia obtenida se editó con ProSeq 3,5 y alineó con todas las secuencias de *C. conanobrieni* disponibles en GenBank. Se obtuvo una secuencia de 488 pares de bases correspondientes a la sección del código de barras genético del gen COI, la matriz de distancias genéticas mostró poca variación al comparar la secuencia obtenida con las disponibles en la base de datos GenBank. Estos resultados confirman la presencia de este nemertino en las langostas *Panulirus argus* en Colombia, y aportan valiosa información para la correcta identificación y detección de esta especie parásita en el país, facilitando así su monitoreo.

PALABRAS CLAVES: Carcinonemertidae, COI, Puebloviejo.

ABSTRACT

Morphological identifications complemented with molecular analysis are important for the delimitation of cryptic species. This document contains annotations on the molecular identification of the parasitic nemertine *Carcinonemertes conanobrieni* in the Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus*. The collected nemertean were found parasitizing ovigerous lobsters from the Gulf of Salamanca (Puebloviejo), Colombia. DNA was extracted from a specimen and a fragment of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI) was amplified using Folmer's universal primers, the sequence was edited with ProSeq 3.5 and aligned with all the *C. conanobrieni* sequences available in GenBank. A sequence of 488 base pairs corresponding to the section of the genetic barcode of the COI gene was obtained, the matrix of genetic distances showed little variation when comparing the obtained sequence with those available in the GenBank database. These results confirm the presence of this nemertean in the *Panulirus argus* lobsters in Colombia providing valuable information for the correct identification and detection of this parasitic species in the country, thus facilitating its monitoring.

KEYWORDS: Carcinonemertidae, COI, Puebloviejo.

DOI: <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2022.51.1.1166>

Publicado por Invemar

Este es un manuscrito de acceso abierto bajo la licencia CC Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual

Published by Invemar
This is an open Access article under the CC BY-NC-SA

La langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* (Latreille, 1804) es un crustáceo decápodo distribuido en Colombia en los departamentos costeros de la Región Caribe, incluyendo el área insular de San Andrés, Providencia y Santa Catalina (Gracia y Díaz, 2002). Esta langosta es considerada uno de los recursos pesqueros más importante para las poblaciones de pescadores artesanales marinos ya que posee el mayor valor económico dentro de los crustáceos que se pescan en el gran Caribe y el Golfo de México (Seijo, 2007; FAO, 2015, 2019).

En departamentos como Magdalena, La Guajira y Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, esta langosta es importante social y económicamente, ya que su extracción es esencial para el sustento de las comunidades de pescadores artesanales. Sin embargo, es considerada como una especie vulnerable en Colombia (Gracia y Díaz, 2002; Minambiente, 2017), debido a la sobreexplotación de su stock pesquero y a la destrucción sistemática de su hábitat. Adicionalmente, existen factores naturales que han contribuido a la disminución de las poblaciones de *P. argus*, tales como enfermedades (v. g. *Panulirus argus* virus 1–PaV1) (Shields y Behringer, 2004) y parásitos (v. g. nemertinos) (Atherley *et al.*, 2020a). Específicamente el parásito *Carcinonemertes conanobrieni* (Simpson, Ambrosio y Baeza, 2017) es un nemertino que se alimenta de los embriones que las hembras ovadas cargan en sus pleópodos, ocasionando efectos negativos sobre el rendimiento reproductivo de la langosta (Baeza *et al.*, 2016; Simpson *et al.*, 2017).

En 2018 se registró por primera vez *C. conanobrieni* en las costas del Caribe de Colombia (González-Cueto y Quiroga, 2018), con base en el análisis morfológico de cuatro individuos encontrados en una langosta ovada del golfo de Salamanca (Magdalena). Sin embargo, era necesario complementar esta información con datos de secuencias genéticas, imprescindibles para delimitar especies crípticas dentro del filo (Sundberg *et al.*, 2016). Además, en el caso de especies de nemertinos asociadas a *P. argus*, las identificaciones moleculares son necesarias ya que en esta langosta se encuentran al menos dos especies del género *Carcinonemertes* (Atherley *et al.*, 2020b).

Se obtuvieron langostas ovadas de la especie *P. argus* capturadas por pescadores artesanales del golfo de Salamanca (10,97982 N; -74,32758 O), municipio de Puebloviejo (Magdalena) (Figura 1). Al examinarlas se aislaron nemertinos en diferentes etapas de desarrollo; algunos de los cuales se fijaron en ETOH al 100 %.

The Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) is a decapod crustacean distributed in the Caribbean coasts of Colombia, including the insular regions of San Andrés, Providencia and Santa Catalina (Gracia and Díaz, 2002). This lobster is considered one of the most important fishing resources for the populations of artisanal marine fishermen since it has the highest economic value within the crustaceans that are fished in the greater Caribbean and the Gulf of Mexico (Seijo, 2007; FAO, 2015, 2019).

In the departments of Magdalena, La Guajira and the Archipelago of San Andrés, Providencia and Santa Catalina, this lobster is socially and economically important, since its extraction is essential for the livelihood of artisanal fishing communities. However, it is considered as a vulnerable species in Colombia (Gracia and Díaz, 2002; Minambiente, 2017), due to the overexploitation of its fishing stock and the systematic destruction of its habitat. Additionally, there are natural factors that have contributed to the decline of *P. argus* populations, such as diseases (e.g., *Panulirus argus* virus 1–PaV1) (Shields y Behringer, 2004) and parasites (e.g., nemertean) (Atherley *et al.*, 2020a). Specifically, the parasite *Carcinonemertes conanobrieni* Simpson, Ambrosio and Baeza, 2017 is a nemertean that feeds on the embryos that ovigerous females carry in their pleopods, causing negative effects on the reproductive performance of the lobster (Baeza *et al.*, 2016; Simpson *et al.*, 2017).

In 2018, *C. conanobrieni* was recorded for the first time on the Caribbean coast of Colombia (Gonzalez-Cueto and Quiroga, 2018), based on the morphological analysis of four individuals found in an ovigerous lobster from the Gulf of Salamanca (Magdalena). However, it was necessary to complement this information with genetic sequence data, essential to delimit cryptic species within the phylum (Sundberg *et al.*, 2016). Furthermore, in the case of nemertean species associated with *P. argus*, molecular identifications are necessary since in this lobster there are at least two species of the genus *Carcinonemertes* (Atherley *et al.*, 2020b).

Ovigerous lobsters of the *P. argus* species were captured by artisanal fishermen from the Gulf of Salamanca (10.97982; -74.32758), Puebloviejo municipality (Magdalena) (Figure 1). Upon examination, nemertean were isolated at different stages of development; some of which were fixed in 100 % ETOH.

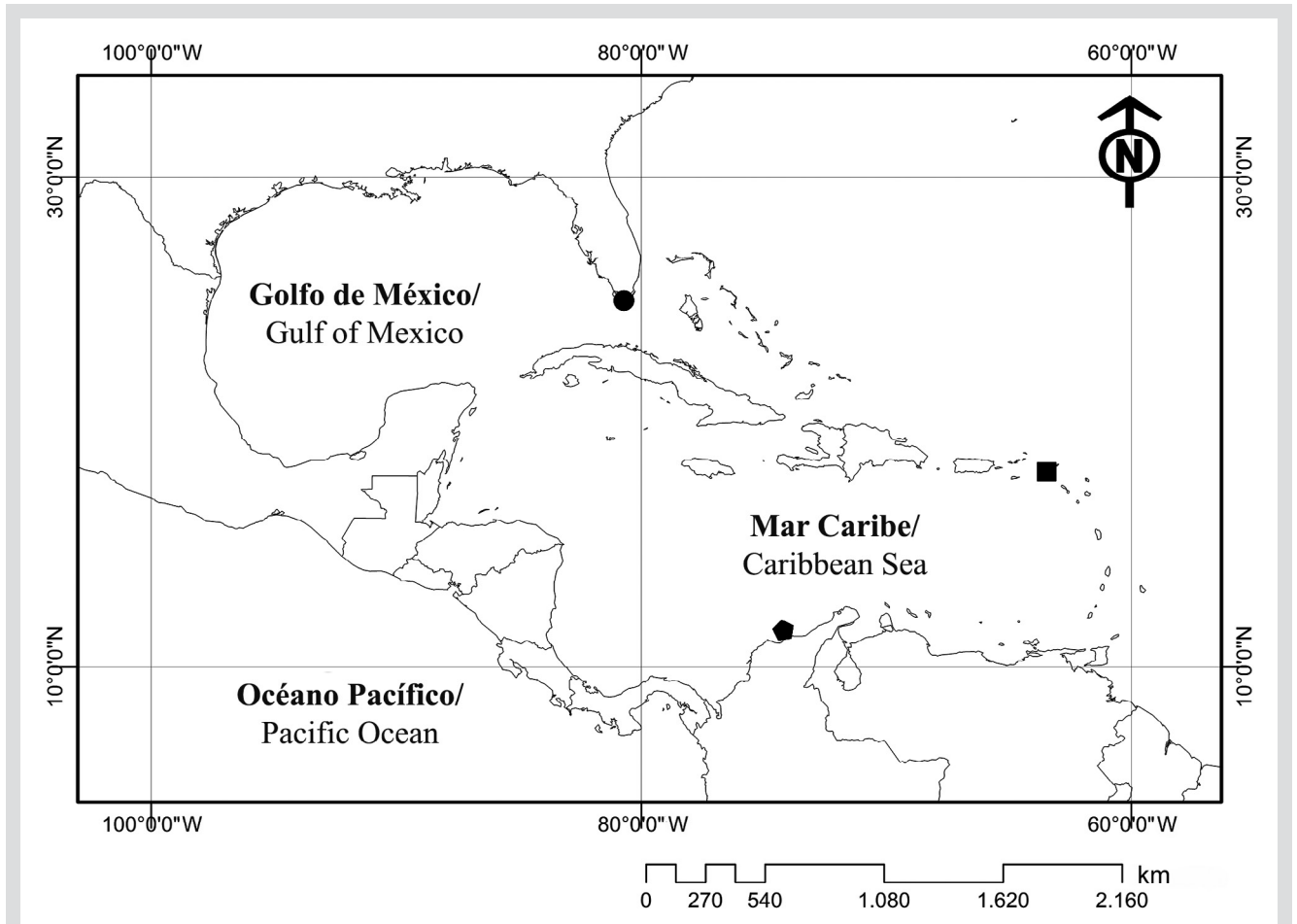


Figura 1. Registros de *Carcinonemertes conanobrieni* en el Golfo de México y el Mar Caribe. El círculo indica la localidad tipo en los Cayos de la Florida (24.7707 N; -80.7615 O – 24.7325 N; -80.9121 O); el pentágono corresponde al registro para la costa Caribe de Colombia (10.97982 N; -74.32758 O); y el cuadrado es el registro para Saint Kitts, West Indies (see Atherley *et al.*, 2020b).

Figure 1. Records of *Carcinonemertes conanobrieni* in the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. The circle indicates the type locality in the Florida Keys (24.7707; -80.7615 – 24.7325; -80.9121); the pentagon corresponds to the record for the Caribbean coast of Colombia (10.97982; -74.32758); and the square is the record for Saint Kitts, West Indies (see Atherley *et al.*, 2020b).

El ADN de uno de los individuos identificados como *C. conanobrieni* se extrajo utilizando el kit QuickExtract™, siguiendo el protocolo del fabricante (Lucigen). La región “Folmer” se amplificó con *primers* universales (Folmer *et al.*, 1994). Las extracciones de DNA se amplificaron usando 2 µL de ADN en un *mix* de PCR con un volumen final de 23 µL que contenía 1,25 µL MgCl₂, 5 µL Buffer 5X (BIOLINE), 1 µL de cada *primer*, 0,625 µL de dNTPs, 13,625 µL de H₂O y 0,5 µL de Taq polimerasa (BIOLASE™, BIOLINE). El programa del termociclador fue: 1 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 s 95 °C, 1 min a 40 °C, 1,5 min a 72 °C y un período de extensión final de 5 min a 72 °C. La secuencia obtenida fue editada con ProSeq 3,5 y alineada con todas las secuencias de *C. conanobrieni* disponibles en GenBank utilizando el algoritmo ClustalW en MEGA (Tamura *et al.*, 2011). Otras secuencias de *Carcinonemertes* sp. registrados

DNA from one of the individuals identified as *C. conanobrieni* was extracted using the QuickExtract™ kit following the manufacturer’s protocol (Lucigen). The “Folmer” region was amplified with universal primers (Folmer *et al.*, 1994). DNA extractions were amplified using 2 µL of DNA in a PCR mix with a final volume of 23 µL containing 1.25 µL MgCl₂, 5 µL 5X Buffer (BIOLINE), 1 µL of each primer, 0.625 µL of dNTPs, 13.625 µL of H₂O and 0.5 µL of Taq polymerase (BIOLASE™, BIOLINE). The thermo-cycler program was: 1 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 40 °C, 1.5 min at 72 °C and a final extension period of 5 min at 72 °C. The sequence obtained was edited with ProSeq 3.5 and aligned with all the *C. conanobrieni* sequences available in GenBank using the ClustalW algorithm in MEGA (Tamura *et al.*, 2011). Other sequences of *Carcinonemertes* sp. reported in *P. argus* by

en *P. argus* por Atherley *et al.* (2020b) se consideraron en el análisis. Se construyó una matriz de distancias genéticas evolutivas intraespecíficas e interespecíficas (Hebert *et al.*, 2003), usando el modelo K2P (Kimura, 1980).

Se obtuvo una secuencia de 488 pares de bases correspondientes a la sección del código de barras genético del gen COI, este se depositó en GenBank con el código de acceso MW205898. La secuencia obtenida tiene una distancia genética que varía entre 0 % y 0,2 % cuando se compara con otros individuos de *C. conanobrieni* y 22,5 % con otras especies de este género encontradas en *P. argus* (Tabla 1).

Estos resultados permiten la confirmación de la presencia de *C. conanobrieni* en Colombia, ya que la distancia genética hallada fue menor a 0,5 % si se compara con otros individuos de *C. conanobrieni* secuenciados por Simpson *et al.* (2017) en la descripción original de la especie. Dentro del grupo Hoplonemertea, el cual contiene al género *Carcinonemertes*, se estima que las distancias interespecíficas son superiores a 5 % (Sundberg *et al.*, 2016).

La información presentada provee herramientas que permiten tener una correcta identificación de las especies de nemertinos que se pueden encontrar parasitando a la langosta. Los resultados de este estudio indican que se deben establecer programas de monitoreo para evaluar el efecto de *C. conanobrieni* en las poblaciones de langosta de Colombia. Para mantener los valores actuales y futuros de pesca y de mercado de *P. argus*, se deben considerar los patógenos y parásitos emergentes, particularmente a la luz de un entorno cambiante.

Tabla 1. Matriz de distancias genéticas interespecíficas e intraespecíficas construida con base en secuencias de 488 pb del gen Citocromo Oxidasa I (COI) utilizando el modelo de evolución de sustitución de nucleótidos K2P (Kimura, 1980). La secuencia generada en este estudio está resaltada en negrita; el resto de secuencias fueron extraídas de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Código / Code GenBank	MW 205898	KY 741564	KY 741565	MT 872632	MT 872633	MT 872634	MT 872628	MT 872629	MT 872630	MT 872631
MW205898	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KY741564	0.2	x	-	-	-	-	-	-	-	-
KY741565	0.2	0.4	x	-	-	-	-	-	-	-
MT872632	0.0	0.2	0.2	x	-	-	-	-	-	-
MT872633	0.0	0.2	0.2	0.0	x	-	-	-	-	-
MT872634	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	x	-	-	-	-

Atherley *et al.* (2020b) were included in the analysis. A matrix of intraspecific and interspecific evolutionary genetic distances was made (Hebert *et al.*, 2003), using the K2P model (Kimura, 1980).

A sequence of 488 base pairs corresponding to the section of the genetic barcode of the COI gene was obtained, this was deposited in GenBank with the access code MW205898. The sequence obtained, possess a genetic distance that varies between 0 % and 0.2 % when compared with other individuals of *C. conanobrieni* and 22.5 % with other species of this genus found in *P. argus* (Table 1).

These results lead to the confirmation of the presence of *C. conanobrieni* in Colombia, since the genetic distance found was less than 0.5 % when compared with other individuals of *C. conanobrieni* sequenced by Simpson *et al.* (2017) in their original description of the species. Within the Hoplonemertea group, which contains the genus *Carcinonemertes*, it is estimated that the interspecific distances are greater than 5 % (Sundberg *et al.*, 2016).

The information herein provides tools that allow for correct identification of the species of nemertean that can be found parasitizing the lobster. The results of this study indicate monitoring programs should be established to evaluate the effect of *C. conanobrieni* on the lobster populations of Colombia. In order to maintain the present and future fishing and market values of *P. argus*, emerging pathogens and parasites must be considered, particularly in light of a changing environment.

Table 1. Matrix of interspecific and intraspecific genetic distances based on 488 bp sequences of the Cytochrome Oxidase I (COI) gene using the K2P nucleotide substitution evolution model (Kimura, 1980). The sequence generated in this study is highlighted in bold; the rest of the sequences were extracted from the GenBank genetic sequence database of the “National Center for Biotechnology Information” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



Código / Code GenBank	MW 205898	KY 741564	KY 741565	MT 872632	MT 872633	MT 872634	MT 872628	MT 872629	MT 872630	MT 872631
MT872628	22.5	22.2	22.9	22.5	22.5	22.5	x	-	-	-
MT872629	22.5	22.2	22.9	22.5	22.5	22.5	0.0	x	-	-
MT872630	22.5	22.2	22.9	22.5	22.5	22.5	0.0	0.0	x	-
MT872631	22.5	22.2	22.9	22.5	22.5	22.5	0.0	0.0	0.0	x

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo derivó del proyecto “Efecto del parásito de crustáceos *Carcinonemertes conanobrieni* sobre el desempeño reproductivo de la langosta espinosa del Caribe, en un contexto de manejo pesquero participativo en el departamento del Magdalena, Colombia” financiado por Fonciencias 2017 de la Universidad del Magdalena, con resolución de permiso número 0080 del 17 de enero del 2019 por parte de la Corporación Autónoma Regional del Magdalena, Corpamag. Especiales agradecimientos a los pescadores artesanales del golfo de Salamanca, quienes ayudaron en la obtención de las langostas especímenes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was derived from the project “Efecto del parásito de crustáceos *Carcinonemertes conanobrieni* sobre el desempeño reproductivo de la langosta espinosa del Caribe, en un contexto de manejo pesquero participativo en el departamento del Magdalena, Colombia” funded by Fonciencias 2017 of the Universidad del Magdalena, with Permit resolution number 0080 of January 17, 2019 by the Corporación Autónoma regional del Magdalena CORPAMAG. Special thanks to the artisanal fishermen of the Gulf of Salamanca, who helped in obtaining the lobsters specimens.

BIBLIOGRAFÍA/ LITERATURE CITED

- Atherley, N.A.M., M.A. Freeman and M.M. Dennis. 2020a. Post-mortem examination of the Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus*, Latreille 1804) and pathology in a fishery of the Lesser Antilles. *J. Invertebr. Pathol.*, 175:107453. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107453>
- Atherley, N.A.M., M.M. Dennis and M.A. Freeman. 2020b. Two species of *Carcinonemertes* Coe, 1902 (Nemertea: Carcinonemertidae) infesting the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae), in Saint Kitts, West Indies. *J. Crust. Biol.*, 40(6): 933-942. <https://doi.org/10.1093/jcobiol/ruaa060>
- Baeza, J.A., L. Simpson, L.J. Ambrosio, N. Mora, R. Guéron and M.J. Childress. 2016. Active parental care, reproductive performance, and a novel egg predator affecting reproductive investment in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *BMC Zool.*, 1(6). <https://bmczool.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40850-016-0006-6>
- FAO. 2015. Report of the first meeting of the OSPESCA/WECAFC/CRFM/CFMC Working group on Caribbean spiny lobster. FAO Fisheries and Aquaculture Report SLC/FIPS/SLM/R1095 (Bi), Panama City, Panama. 112 p.
- FAO. 2019. Report of the second meeting of the OSPESCA/WECAFC/CRFM/CFMC Working Group on Caribbean Spiny Lobster. FAO Fisheries and Aquaculture Report, Santo Domingo. 68 p.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294-299.
- González-Cueto, J.A. and S. Quiroga. 2018. First record of *Carcinonemertes conanobrieni* Simpson, Ambrosio & Baeza, 2017 (Nemertea, Carcinonemertidae), an egg predator of the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804), on the Caribbean coast of Colombia. *Check List*, 14(2): 425-429. <https://doi.org/10.15560/14.2.425>
- Gracia, A. y J. M. Díaz. 2002. *Panulirus argus*: 113-115. En Ardila, N., G. R. Navas y J. Reyes (Eds.). Libro rojo de los invertebrados marinos de Colombia. Invenmar. Ministerio del Medio Ambiente. La serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Bogotá. 177 p.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham and J. R. de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 270 (Suppl 1): S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2):111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

- Minambiente. 2017. Resolución 1912 de 2017. Por la cual se establece el listado de las especies silvestres amenazadas de la diversidad biológica colombiana continental y marino costera que se encuentran en el territorio nacional, y se dictan otras disposiciones. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, fecha de expedición: 15/09/2017_ Diario Oficial No. 50364 del 22 de septiembre de 2017.
- Seijo, J.C. 2007. Considerations for management of metapopulations in small-scale fisheries of the Mesoamerican barrier reef ecosystem. *Fish. Res.*, 87(1): 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2007.06.016>
- Shields, J. D. and Behringer, D. C. 2004. A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Dis. Aquat. Organ.*, 59(2):109-118. <https://doi.org/10.3354/dao059109>
- Simpson, L.A., L.J. Ambrosio and J.A. Baeza. 2017. A new species of *Carcinonemertes*, *Carcinonemertes conanobrieni* sp. nov. (Nemertea: Carcinonemertidae), an egg predator of the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. *PLoS One*, 12(5): e0177021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177021> <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155541>
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

RECIBIDO/RECEIVED: 23/03/2020

ACEPTADO/ACCEPTED: 28/10/2021