

Confirmación molecular de tres especies de bivalvos xilótrofos (Familia Teredinidae) en las bahías de Cartagena y Barbacoas, mar Caribe, Colombia

Michael J. Ahrens^{1*}, Reuben Shipway², Susana Caballero³,
Ángela M. Moncaleano-Niño¹, Andrea Luna-Acosta¹, Samuel Casseres Ruiz¹

¹Universidad de Bogotá, Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia. ²University of Portsmouth, Portsmouth, United Kingdom. ³Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia. *Autor para correspondencia: michael.ahrens@utadeo.edu.co

Molecular Confirmation of three xylophagous bivalve species (Family Teredinidae) from Cartagena Bay and Barbacoas Bay, Caribbean Sea, Colombia.

Abstract

Despite the existence of extensive mangrove habitat, only few studies have described the diversity of wood-boring teredinid bivalves in Colombia. The present study was undertaken to explore whether teredinid bivalves are present in the Bay of Cartagena and adjacent Bay of Barbacoas. In a field study conducted in March 2013, ten individuals belonging to two teredinid genera, corresponding morphologically to *Neoteredo reynei* and *Bankia* spp. were encountered in two locations on submerged red mangrove roots (*Rhizophora mangle*). Initial morphological identifications were complemented with molecular identification. For this purpose, two gene fragments were sequenced, namely, 588 base pairs (bp) of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) and 305 bp of the small ribosomal subunit (18S) nuclear gene. Basic alignment searches and phylogenetic trees using publically available and unpublished CO1 and 18S sequences of other Teredinidae species confirm the identity of *Neoteredo reynei* in Barbacoas Bay. In contrast, sequences obtained for *Bankia*, indicate the presence of two distinct species in Cartagena Bay. The confirmation of, at least, three teredinid species in Cartagena Bay and Barbacoas Bay suggests the presence of additional species and warrants intensifying sampling effort on this ecologically and economically important group of wood decomposers.

Keywords: Teredinidae, molecular taxonomy, CO1, 18S, mangroves, xylophagous bivalves.

Editor: Hernández J.

Citation: Ahrens MJ, Shipway R, Caballero S, Moncaleano-Niño AM, Luna-Acosta A, Casseres Ruiz S (2013) Molecular Confirmation of three xylophagous bivalve species (Family Teredinidae) from Cartagena Bay and Barbacoas Bay, Caribbean Sea, Colombia. Revista Mutis. vol. 3 (2) pag. 6-12

Received: June 18, 2013; **Accepted:** October 20, 2013; **Published on line:** December 15, 2013

Copyright: ©2013 Ahrens MJ *et al.* This is an open-access article, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Competing Interests: The authors have no conflict of interest.

Resumen

A pesar de la existencia de un extenso hábitat de manglares en Colombia, solo unos pocos estudios han descrito la diversidad de bivalvos teredinidos xilótrofos (conocidos como “broma”) en el país. El presente estudio investigó la presencia de bivalvos teredinidos en las bahías de Cartagena y Barbacoas. En un estudio de campo llevado a cabo en marzo de 2013, diez individuos de dos géneros de Teredinidae, correspondientes



morfológicamente a *Neoteredo reynei* y *Bankia* spp., fueron encontrados en las raíces sumergidas de mangle rojo (*Rhizophora mangle*). Identificaciones morfológicas iniciales se complementaron con identificación molecular. Para esto, dos fragmentos de genes fueron secuenciados: 588 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (CO1) y 305 pb del gen nuclear de la subunidad ribosómica pequeña (18S). Búsquedas de alineación básica (BLAST) y árboles filogenéticos utilizando secuencias de CO1 y 18S de otras especies de Teredinidae públicamente disponibles y no publicadas confirmaron la identidad de *Neoteredo reynei* en la bahía de Barba-coas. En contraste, las secuencias obtenidas para *Bankia*, indicaron la presencia de dos especies distintas en la bahía de Cartagena. La confirmación de al menos tres especies de Teredinidae en las bahías de Cartagena y Barbacoas sugiere la presencia de especies adicionales y justifica un mayor esfuerzo de muestreo para este grupo de descomponedores de madera tan importante ecológica y económicamente.

Palabras clave: Teredinidae, taxonomía molecular, gen CO1, gen 18S, manglar, bivalvos xilótrofos.

Introducción

Los bivalvos de la familia Teredinidae (conocidos como “broma”) son moluscos con distribución global que viven en madera viva, o madera que se encuentra flotando o hundida, en aguas con profundidades entre los 0 y 150 m. Tienen la capacidad de excavar y digerir madera (xilotrofia) y son considerados los degradadores principales de madera en las zonas marino-cos-teras templadas y tropicales (Distel *et al.*, 2011). Por esta capacidad, también son considerados entre los organismos marinos más destructivos (Turner, 1966). En siglos pasados, los Teredinidae constituyeron una amenaza considerable para la navegación, debido a su notoria capacidad para perforar la madera de los cascos de naves en poco tiempo (dejando túneles ramificados con diámetro de hasta 1 cm, como lo hace la especie *Teredo navalis*), resultando en la erosión y debilitación de las naves y su hundimiento eventual. Por ejemplo, se presume que la derrota de la Armada Española en 1588 fue ayudada por cascos de las na-

ves debilitados por bivalvos teredinidos (Distel *et al.*, 2011). Actualmente, a pesar de que los buques cuentan con casco de acero, los teredinidos siguen causando daños a estructuras marinas, como pilotes y muelles, equipos de pesca y artefactos arqueológicos como buques naufragados (Borges *et al.*, 2012), causando pérdidas económicas valoradas anualmente en cifras de miles de millones de dólares (Southwell & Bultman, 1971, Distel *et al.*, 2011).

Los Teredinidae son una familia diversa de bivalvos con más de 65 especies descritas morfológicamente (Turner 1966, Distel *et al.*, 2011), pero con una taxonomía compleja. La característica típica de toda la familia es su forma corporal muy alargada (resultando en su nombre común en inglés de “shipworms”), que corresponde a una adaptación para excavar madera. Como resultado de su morfología vermiforme, los teredinidos han experimentado modificaciones notables de la anatomía típica de los moluscos. Por ejemplo, gran parte de las vísceras (branquias, corazón, riñones, gónadas y la mayor parte del sistema digestivo) se encuentran fuera de las dos conchas, que han cambiado su función pasando de ser estructuras de protección a ser herramientas para excavar, por lo cual su tamaño es muy reducido. Para lograr protección frente a la desecación o a los depredadores, los teredinidos viven en las galerías de madera que han excavado y que han sido recubiertas por dentro por una lámina de carbonato de calcio. Además, todos los Teredinidae tienen un par de estructuras calcáreas en el extremo posterior de su cuerpo, llamadas paletas (“pallets” en inglés), que les permite tapar los túneles desde adentro (Figura 1).

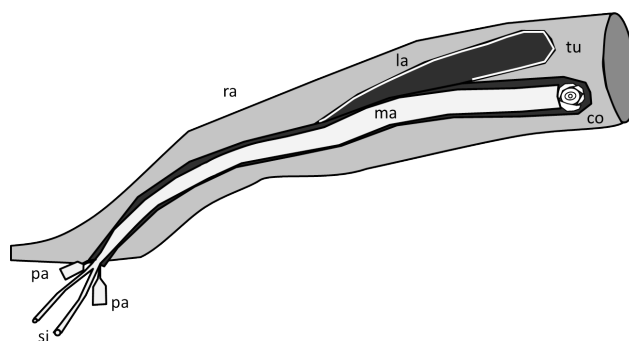


Figura 1. Diagrama esquemático de un bivalvo teredinido en su túnel excavado de una raíz de mangle (co concha, ma manto, la lámina calcárea del túnel, pa paletas, ra raíz de mangle, si sifón, tu túnel). Dibujo adaptado con modificaciones de Myers, P., R. Espinosa, C.S. Parr, T. Jones, G.S. Hammond, and T.A. Dewey. 2014. The Animal Diversity Web (en línea), accedi-do por <http://animaldiversity.org>.

Una dificultad notoria para la identificación y para la sistemática de los bivalvos teredinidos es la escasez de estructuras morfológicas distintas. El cuerpo blanco exterior tiene pocas características específicas y las conchas, debido a su función principal excavadora, tienen alta variación intraespecífica. Por esta razón la característica descriptiva principal de los Teredinidae ha sido la morfología de las paletas, formando la base para la descripción taxonómica del grupo, como el trabajo realizado por Ruth Turner (1966) que continúa siendo la autoridad en la taxonomía de este grupo. Sin embargo, debido a que son estructuras pequeñas y frágiles, las paletas muchas veces se pierden durante la extracción de los especímenes, resultando en que muchas veces los investigadores con poco conocimiento sobre los teredinidos almacenan solamente fragmentos de un espécimen. Finalmente, la forma de las paletas también puede variar bastante en forma y color entre individuos de la misma especie como consecuencia del tipo de madera en la cual se encuentra el individuo y por otras condiciones ambientales.

Para lograr una identificación más rigurosa de las especies de Teredinidae, se ha recomendado integrar la identificación morfológica con marcadores moleculares (Borges *et al.*, 2012). Estudios taxonómicos recientes se han basado en utilizar el gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (CO1, Borges *et al.*, 2012), recomendado como un “código de barras” por Hebert *et al.* (2003), o las secuencias del rARN nuclear correspondientes a la subunidad ribosómica pequeña (18S) y grande (28S) (Distel *et al.*, 2011). Estos datos moleculares no solamente han permitido una identificación mucho más confiable de especímenes, sino que también han llevado a realizar una reevaluación crítica de la sistemática de esta familia, indicando la polifilia de algunos subgrupos anteriormente descritos, basados únicamente en la morfología de las paletas (Santos *et al.*, 2005, Distel *et al.*, 2011, Borges *et al.*, 2012).

En Colombia no se conoce mucho sobre la diversidad de los bivalvos Teredinidae, aunque gran parte de la costa Caribe de Colombia está compuesto de manglares, que es un hábitat ideal para este grupo. A la fecha, los únicos reportes colombianos para bivalvos teredinidos son para la Ciénaga Grande de Santa Marta (von Cosel, 1986; Díaz & Puyana, 1994) y el golfo de Urabá (Sánchez-Alfárez & Álvarez-León, 2000). El presente estudio se realizó con el objetivo de (1) examinar la presencia de bivalvos teredinidos en las bahías

de Cartagena y Barbacoas, y (2) identificar posibles individuos encontrados utilizando taxonomía morfológica y marcadores moleculares (los genes CO1 y 18S).

Materiales y Métodos

Raíces de mangle rojo (*Rhizophora mangle*) semisumergidas fueron colectadas de dos sitios en la bahía de Cartagena (cerca del muelle Contecar) y bahía de Barbacoas (isla de Barú) en marzo de 2013 (Figura 2, Tabla 1). Las raíces en las cuales se observaron huecos o cavidades fueron transferidas al laboratorio, en donde se extrajeron los teredinidos encontrados. A cada espécimen encontrado, se le midió su longitud y se fotografió, antes de preservarlo en etanol al 96 %. Las identificaciones morfológicas se basaron en las descripciones de Bartsch (1922), DeMoraes & Lopes (2003) y von Cosel (1986). Para la identificación molecular, dos fragmentos de genes fueron secuenciados: (1) el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (CO1, 658 pb), y (2) el gen nuclear de la subunidad ribosómica pequeña (18S, 348 pb). Para cada espécimen, un cubo de tejido (2 x 2 mm) fue disectado del manto y transferido a un microtubo con etanol al 96 %. El ADN del tejido fue extraído utilizando un kit comercial (MoBio), siguiendo las instrucciones del proveedor. El gen CO1 fue amplificado utilizando los *primers* descritos por Folmer *et al.* (1994), mientras el gen 18S fue amplificado con los *primers* descritos por Baxter *et al.* (1998) y Distel *et al.* (2011). Los productos de PCR se purificaron utilizando polietilenglicol y fueron secuenciados por Macrogen, Corea (para el gen CO1) y la Universidad de Portsmouth, Reino Unido (para el gen 18S). Las secuencias para los genes CO1 y 18S fueron editadas y alineadas con MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias fueron sometidas a GenBank y comparadas con secuencias de otras especies de Teredinidae públicamente disponibles en GenBank y no publicadas (R. Shipway, resultados no publicados), para confirmar la identidad de especies y asegurar que no había ocurrido la amplificación no intencional del ADN correspondiendo a contaminantes o bacterias endosimbióticas. Otro paso de alineación se realizó con Clustal W (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias de CO1 fueron traducidas para detectar cualquier mutación de tipo frame-shift, codones stop o perfiles anormales de aminoácidos. Para hacer inferencias filogenéticas, se utilizó una longitud de 588 pb para CO1 y 305 pb para 18S, respectivamente. Se realizaron reconstrucciones filogenéticas de tipo

Neighbour-joining (NJ) de manera separada para las secuencias de CO1 y 18S, utilizando el software MEGA 5.1 y aplicando el modelo de Kimura 2-parametros (K2P), de acuerdo con Borges *et al.* (2012). Como grupo externo (“outgroup”) se utilizaron las secuencias de la venera *Pecten jacobaeus* para el gen CO1 y de la almeja xilófaga *Pholas dactylus* para el gen 18S.

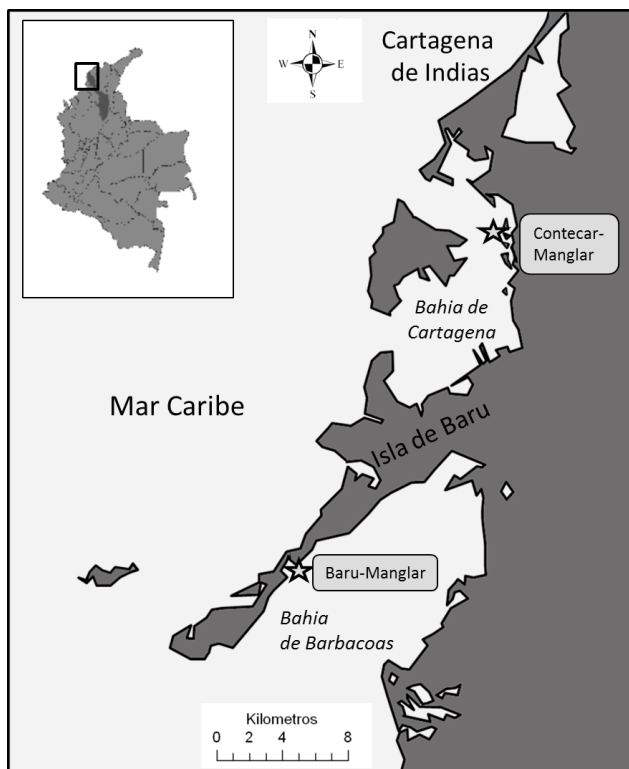


Figura 2. Área de muestreo, indicando los dos sitios de colección en la bahía de Cartagena (Contecar) y bahía de Barbacoas (Barú).

Tabla 1: Coordenadas de los sitios de muestreo.

Sitio	Latitud	Longitud
Contecar Manglar (Cartagena)	10° 22' 8.17" N	75° 30' 54.42" W
Barú Manglar (Barbacoas)	10° 10' 40.52" N	75° 38' 25.22" W

Resultados y Discusión

Identificación morfológica

En cada una de las bahías, se encontraron raíces de mangle (*Rhizophora mangle*) infestadas fuertemen-

te por bivalvos teredinidos (Figura 3). Dos géneros de Terebinidae fueron identificados morfológicamente: 5 individuos de *Neoteredo reynei*, de longitud de hasta 50 cm (Figuras 3-5), fueron encontrados en una ciénaga de la isla de Barú (bahía de Barbacoas). La morfología de las paletas (Figura 6A) y la presencia de un borde de tejido cerca del posterior (“dorsal lappets” en inglés) coincidió con la descripción de Bartsch (1922) y DeMoraes & Lopes (2003) para *Neoteredo reynei*. Al contrario, en un manglar frente al terminal de Contecar de Cartagena, se encontraron 5 individuos de *Bankia* spp., de longitud de hasta 4 cm (Figuras 6B y 7). La morfología de las paletas segmentadas (Figura 6B) correspondió a la del género *Bankia*.



Figura 3. *Neoteredo reynei* recogido de una raíz de *Rhizophora mangle* (Barú). Foto: M. Ahrens.



Figura 4. *Neoteredo reynei* (parte anterior con concha) dentro una cavidad de madera. Foto: M. Ahrens.



Figura 5. Tubo calcáreo de *Neoterredo reynei* dentro de una raíz de mangle. Foto: M. Ahrens.

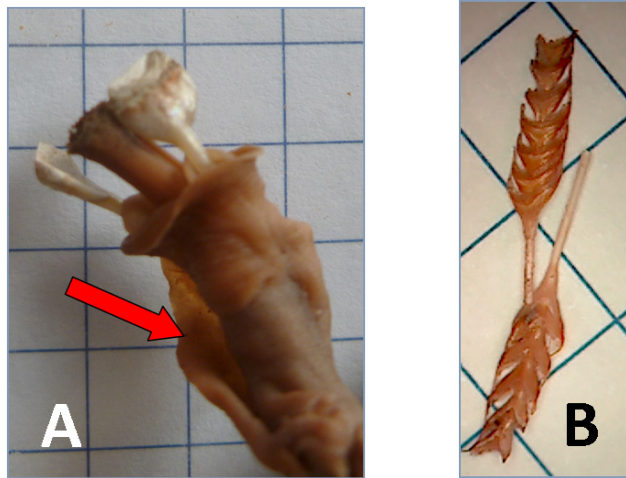


Figura 6. Paletas de A. *Neoterredo reynei* (incl. lapet dorsal, flecha), y B. *Bankia* sp. Foto: M. Ahrens.

Secuenciación del gen CO1:

Para el gen CO1, se lograron obtener dos secuencias para *N. reynei* (588 pb) y dos secuencias para *Bankia* sp. (588 pb). Una búsqueda BLAST no logró identificar los especímenes a nivel de especie, muy seguramente debido a la falta de secuencias para estas especies en la base de datos de referencia. La homología más cercana obtenida para las secuencias CO1 fue con *Lyrodus pedicellatus* (81 %), para las muestras de *Neoterredo reynei*, y con *Bankia carinata* (81 %), para las muestras de *Bankia* spp. Un árbol filogenético (Figura

8), construido de acuerdo con las recomendaciones de Borges *et al.* (2012), utilizando las secuencias de CO1 de otras especies de Teredinidae públicamente disponibles y no publicadas (R. Shipway, resultados no publicados), indicó una agrupación distinta para *Neoterredo reynei* (cerca de la especie *Dicyathifer manni*) y de *Bankia* sp. (cercanamente relacionado, pero diferente de *Bankia carinata*).



Figura 7. *Bankia* sp. (flecha) en una cavidad de una raíz de *Rhizophora mangle*. Foto: M. Ahrens.

Secuenciación del gen 18S:

Para el gen 18S se lograron obtener 5 secuencias para *N. reynei* (305 pb). Una búsqueda BLAST en las bases de BOLD y GenBank y un árbol filogenético, construido con secuencias de 18S de otras especies de Teredinidae públicamente disponibles y no publicadas (Figura 9), confirmó la identidad de *Neoterredo reynei* con un valor de homología (max ID) de 100 % en la bahía de Barbacoas. Para *Bankia* spp. se lograron obtener tres secuencias para el gen 18S (291-302 pb). Un árbol filogenético (Figura 9) construido con estas secuencias y las de otras especies de Teredinidae públicamente disponibles y no publicadas (R. Shipway, resultados no publicados) indicó la presencia de dos especies distintas de "*Bankia*" en la bahía de Cartagena, las cuales se agruparon con un complejo de especies compuesto por miembros de los géneros *Bankia*, *Teredo* y *Lyrodus*. Este hallazgo soporta la sugerencia que el género *Bankia* (y la subfamilia Bankiinae) corresponde a una agrupación artificial. En el pasado, las subfamilias de los Teredinidae fueron diferenciadas principalmente según las características morfológicas de sus paletas, con los miembros de la subfamilia

Bankiinae mostrando una segmentación de las paletas (Figura 6B), mientras que las paletas de las Tereidininae y Kuphinae eran fusionadas (Figura 6A) (Turner, 1966). Sin embargo, el tipo de paletas no es una característica confiable para la identificación, debido a que juveniles de *Bankia carinata* tienen paletas no segmentadas, mientras que los adultos maduros tienen paletas segmentadas (Turner, 1966). Además, estudios moleculares recientes (Santos *et al.*, 2005, Distel *et al.*, 2011) han puesto en duda la monofilía de las subfamilias definidas morfológicamente, mostrando al contrario que *Bankia carinata* y *Kuphus polythalamia* se agrupan con miembros de los Tereidininae en cladogramas construidos utilizando los genes 18S y 28S. El cladograma para el gen 18S en el presente estudio reafirma esta conclusión, indicando un ancestro común para *Lyrodus pedicellatus*, *Teredo sommersi* (ambos de la subfamilia Tereidininae) y *Bankia carinata* y varias ramas para el complejo “*Bankia*” (Figura 9), poniendo en duda que el género *Bankia* corresponda a un agrupamiento taxonómico natural (quiere decir, con un ancestro común que es exclusivo para la subfamilia).

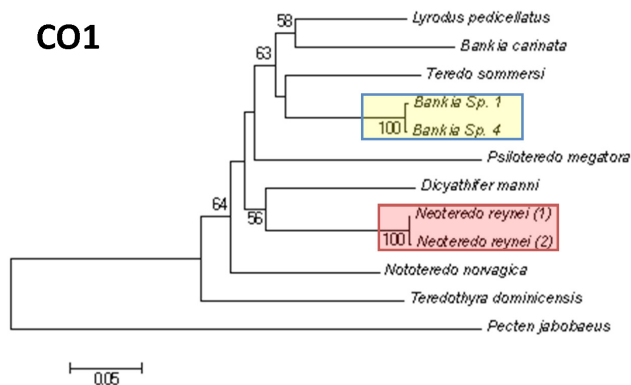


Figura 8. Árbol filogenético construido de las secuencias del gen CO1 de los Tereidinidae. Ubicación de los especímenes de este estudio indicada por color amarillo (*Bankia* sp.) y rosado (*Neoterredo reynei*). Especies con secuencias disponibles indicadas con asterisco. Como grupo externo (“outgroup”) se utilizó la venera *Pecten jacobaeus*.

Este trabajo es el primer reporte de bivalvos teredinidos para las bahías de Cartagena y de Barbacoas. Sin embargo, *N. reynei* ya había sido reportado para Colombia en el golfo de Urabá (Sánchez-Alfárez & Álvarez-León, 2000) y varias especies de *Bankia* ya han sido reportadas para la Ciénaga Grande de Santa Marta (von Cosel, 1986, Díaz & Puyana, 1994). Ambos géneros tienen una distribución tropical (ocurriendo, en

el sur de EE. UU. y Brasil, entre otros). No es claro si su detección en las bahías de Cartagena y Barbacoas corresponda a un establecimiento reciente o a una falta de estudios. El encontrar al menos tres especies de Tereidinidae en las bahías de Barbacoas y Cartagena, apunta hacia la probabilidad de que haya especies adicionales, lo cual justificaría un mayor esfuerzo de muestreo en vista de la importancia económica y el significativo rol ecológico de este grupo poco conocido de descomponedores de madera.

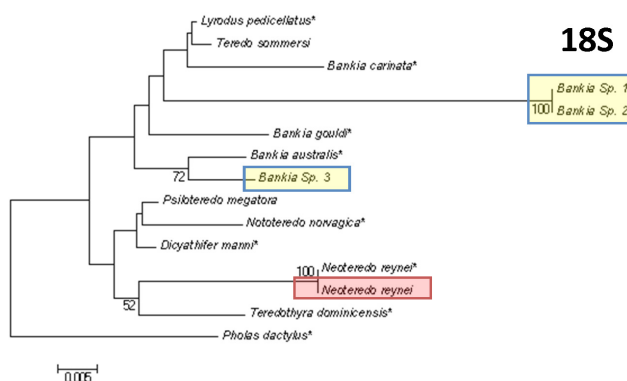


Figura 9. Árbol filogenético construido de las secuencias del gen 18S de los Tereidinidae. Ubicación de los especímenes de este estudio indicada por color amarillo (*Bankia* sp.) y rosado (*Neoterredo reynei*). Especies con secuencias disponibles indicadas con asterisco (*). Como grupo externo (“outgroup”) se utilizó *Pholus dactylus*.

Referencias

- Bartsch, P. (1922). A monograph of the American shipworms. Smithsonian Institution. *U.S. Nat. Mus. Bull* 122: 1-50.
- Borges, L. M. S., Sivrikaya, H., Le Roux, A., Shipway, J. R., Cragg, S. M., & Costa, F. O. (2012). Investigating the taxonomy and systematics of marine wood borers (Bivalvia: Tereidinidae) combining evidence from morphology, DNA barcodes and nuclear locus sequences. *Invertebrate Systematics*, 26: 572-582.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., & Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392: 71-75.
- DeMoraes, D. T., & Lopes, S. G. B. C. (2003). The functional morphology of *Neoterredo reynei* (Bartsch,

- 1920) (*Bivalvia*, *Teredinidae*). *J. Moll. Stud.* 69: 311-318.
- Distel, D., Mehwish, A., Burgoyne, A., Linton, E., Mamangkey, G. Morrill, W., Nove, J. Wood, N., & Yang, J. (2011). Molecular phylogeny of *Pholadoidea* Lamarck, 1809 supports a single origin for xylophagy (wood feeding) and xylophagous bacterial endosymbiosis in *Bivalvia*. *Mol. Phylogen. Evol.* 61: 245-254.
- Díaz, J. & Puyana, M. (1994). *Moluscos del Caribe colombiano, un catálogo ilustrado*. Colciencias y Fundación Natura Colombia. Santa Fe de Bogotá.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294-299.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Waard. J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B (Suppl.)* 270: 296-299.
- Sánchez-Alfárez, A. S., & Álvarez-León, R. 2000. *Neoteredo reynei* (*Bivalvia*: *Teredinidae*) in the mangrove swamps of the Colombian Caribbean. *UCR-Revista de Biología Tropical*, 48 (2/3): 720.
- Santos, S. M. L., Tagliaro, C. H., Beasley, C. R., Schneider, H., Sampaio, I., Santos, C., & Muller, A. C. D. (2005). Taxonomic implications of molecular studies on northern Brazilian *Teredinidae* (*Mollusca*, *Bivalvia*) specimens. *Genet. Mol. Biol.* 28: 175-179.
- Southwell, C. R., & Bultman, J. D. (1971). Marine Borer Resistance of Untreated Woods Over Long Periods of Immersion in Tropical Waters. *Biotropica*, 3 (1): 81-107.
- Tamura K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Turner, R. D. (1966). *A survey and illustrated catalogue of the Teredinidae (Mollusca: Bivalvia)*. The Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA.
- von Cosel, R. (1986). Moluscos de la región de la Ciénaga Grande de Santa Marta (Costa del Caribe de Colombia). *An. Inst. Inv. Mar. Punta Betín*, 15-16:79-370.