

# Análisis comparativos brutos y cuantitativos de percebes epibióticos *Chelonibia* spp. sugieren separación de morfotipos independientes del huésped

E.C. Hyatt<sup>1, 2, 3</sup>, W.K. Hayes<sup>1</sup>, R.T. Gamariello<sup>1, 2, 3</sup>, & S.G. Dunbar<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Marine Research Group, Department of Earth and Biological Sciences, Loma Linda University, Loma Linda, CA, USA

<sup>2</sup>Department of Earth and Biological Sciences, School of Medicine, Loma Linda University, Loma Linda, CA, USA

<sup>3</sup>Protective Turtle Ecology Center for Training, Outreach, and Research, Inc. (ProTECTOR, Inc.), Loma Linda, CA, USA

## INTRODUCCIÓN

- Los percebes de *Chelonibia* son epibiontes obligados, previamente reconocidos como cuatro especies<sup>1,2,3</sup> en base a características externas dispares y asociación de hospedadores:
  - C. caretta* y *C. testudinaria* son especialistas en tortugas<sup>1,2</sup>
  - C. patula* están generalmente asociados a crustáceos<sup>4</sup>
  - C. manati*, típicamente asociada con manatis<sup>5,6</sup>
- Cheang et al. determinaron que las longitudes relativas de los cirros IV - VI, así como la longitud del orificio rostrocarinal, separaban mejor a *C. testudinaria* y *C. patula* morfológicamente<sup>7</sup>.
  - La similitud molecular puede ser indicativa de plasticidad del desarrollo en lugar de especiación.
- Zardus et al. sugieren que *C. testudinaria*, *C. patula* y *C. manati* comprenden una sola especie cosmopolita que se adhiere a animales marinos móviles, con una variabilidad morfológica determinada por el entorno del huésped<sup>3</sup>.
  - Hipótesis de plasticidad fenotípica específica del huésped.
- Ni *C. testudinaria*, *C. manati*, ni *C. patula* y *C. manati* se han comparado directamente morfológicamente. Los análisis genéticos entre las tres formas están limitados en tamaño de muestra y caracteres sujetos a análisis<sup>3,5,7</sup>.
- C. testudinaria* y *C. patula* se han documentado en sustratos inanimados<sup>8,9</sup>, y los tres morfotipos recolectados, a veces juntos, de huéspedes atípicos<sup>4,10</sup>.
  - A pesar de esto, todos fueron clasificados recientemente como morfotipos específicos del huésped bajo el nombre de *C. testudinaria*<sup>3</sup>.

## OBJETIVOS

- Medición de los caracteres externos de prueba y longitud de los cirros terminales de tres morfotipos de *Chelonibia*.
- Microscopía electrónica de barrido (SEM) para comparar la morfología de los morfotipos de *C. manati* y *C. testudinaria*.
- Análisis de función discriminante (DFA) de datos y de componentes principales del análisis de componentes principales (PCA)
- Investigar la relación filogenética del género *Chelonibia* a través de análisis genéticos utilizando loci mitocondriales y nucleares.

## HYPÓTESIS

Presumimos que los tres morfotipos de *C. testudinaria* son subespecies, y potencialmente tres especies separadas, en base a una variación morfológica significativa. Esperamos tener suficiente evidencia para diferenciar las relaciones percebe-huésped en función de la morfología que puede dilucidarse aún más con un muestreo genético.

## MÉTODOS

### Morfología

- Medimos la longitud del orificio (ORL), el ancho del orificio (ORW), la longitud basal (BL), el ancho basal (BW), la altura carinal (CAR), la altura de la tribuna (ROST) (Figura 1) y la longitud del basípodo a la punta de los cirros IV, V y VI (Figura 2). Estas medidas se utilizaron para calcular la conicidad y la elipticidad.
- Sometimos los 11 atributos morfológicos a DFA.

- Para evaluar las diferencias de setas, realizamos SEM de los morfotipos de *C. testudinaria* y *C. manati* y medimos cuatro atributos para cada uno de los cirros IV - VI:
  - Total 12 atributos (Figura 3)

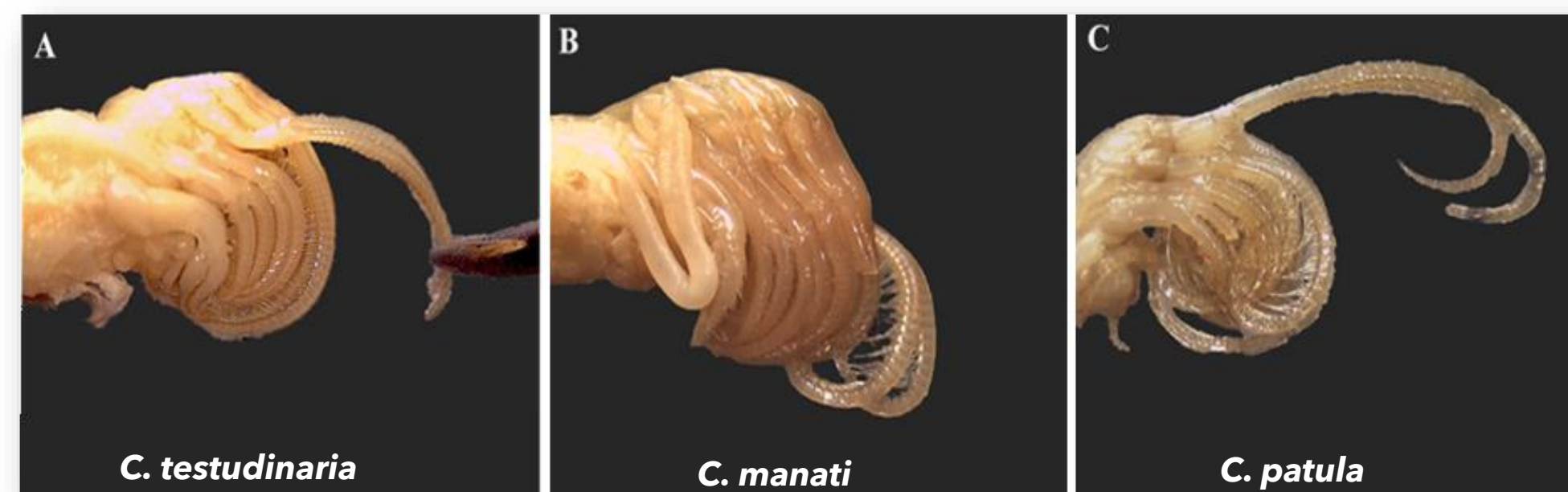


Figure 2: Especímenes representativos para microscopía de disección y medición cirral. (A) Especimen de *Chelonibia testudinaria* CT052 posicionado con pares de ramas de cirro IV extendidos con aguja de punta curva; (B) Especimen CM032 de *C. manati* con pares de ramas de cirro VI extendidas; y (C) espécimen de *C. patula* CT081 con ramas emparejadas de cirro V extendido.

### Genética

- Elegimos dos loci de mtDNA: 16s rRNA y una sección de 771 bases del gen de la citocromo oxidasa 1 (COI), así como una secuencia aislada del genoma nuclear (28s rRNA), para una secuencia concatenada total de > 1600 bases.
- Completamos los análisis genéticos y la construcción de árboles utilizando árboles de muestreo de análisis evolutivo bayesiano (BEAST).
- TreeAnnotator v2.6.6 para procesar todos los árboles de salida y DensiTree, Tree Set Visualizer versión 2.2.7 para la generación de figuras.
- SplitsTree5 v5.0.0 con consolidación de un solo árbol utilizando el método de grupo de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA).

## RESULTADOS

### Morfología

- 86 *C. testudinaria*, 34 *C. manati* y 7 *C. patula* tenían caparazones intactos de los cuales se registraron nueve medidas y se usaron para calcular una media geométrica para el tamaño total.
- El DFA de tres grupos mostró grupos específicos de taxón con el 80,6% de los casos clasificados con especies esperadas.
- El éxito de la clasificación fue del 85,4% (Figura 4).
- SEM de cirros mostró que tanto *C. testudinaria* como *C. manati* poseen dos pares de setas largas y dentadas intercaladas con un grupo de setas cortas y simples de cada segmento (Figura 5).
- El DFA inicial que controlaba el tamaño del cuerpo dio como resultado una discriminación del 94,1 % en la clasificación de los casos agrupados originales y los casos agrupados con validación cruzada. El DFA paso a paso de 12 variables mostró una discriminación del 94,7% con discriminación recíproca entre los dos grupos. >87%.

### Genética

- El análisis filogenético de la secuencia concatenada parece respaldar la conespecificidad entre las especies. A pesar de la aparente apomorfia morfológica, no se detecta monofilia genética entre los especímenes de percebes recolectados de huéspedes de manatíes o tortugas (Figura 6).

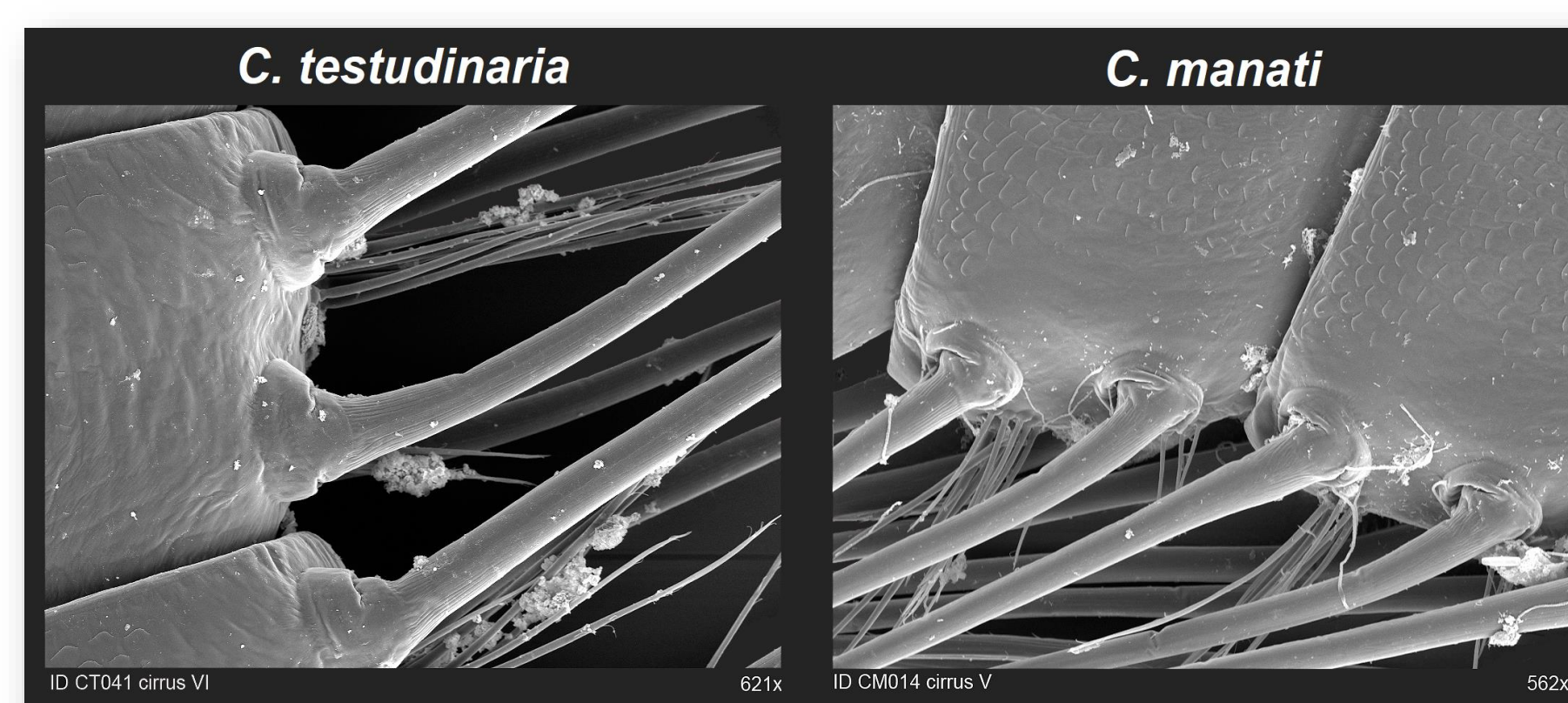


Figure 5: Setas de *C. testudinaria* (621x, izquierda) y *C. manati* (562x, derecha). El tipo de setal fue uniforme entre los dos morfotipos. Había significativamente más segmentos cm<sup>-1</sup> (p<0.001 para cada uno de los cirri) en especímenes de *C. manati*, lo que indica un mayor número de setas de barrido por cirro en general.

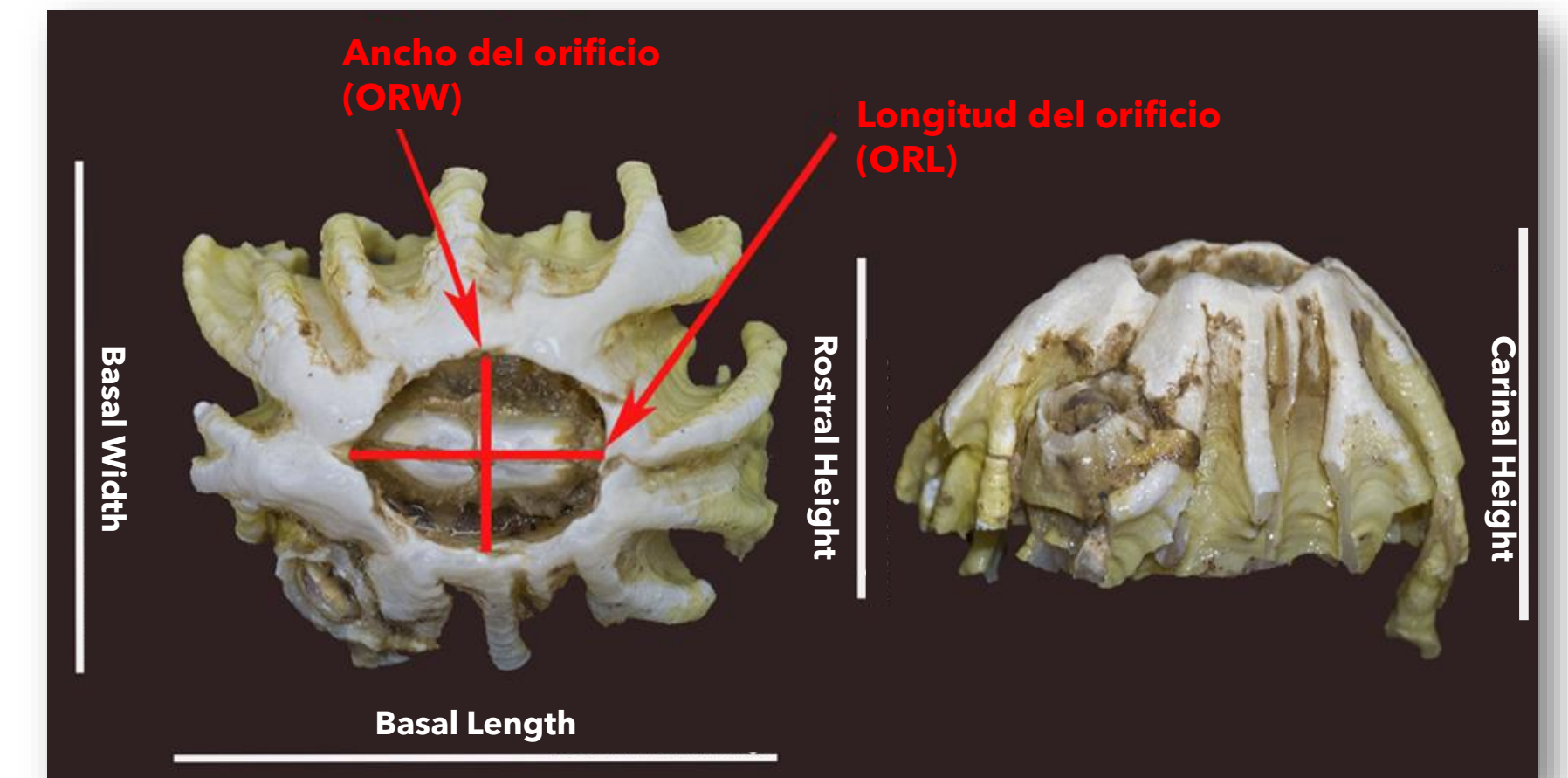


Figure 1: *Chelonibia manati* specimen CM038 (FWRI) as illustration of external test measurements. In *C. manati* specimens, BL, BW, CAR, and ROST recorded at the widest margin of the ridges.

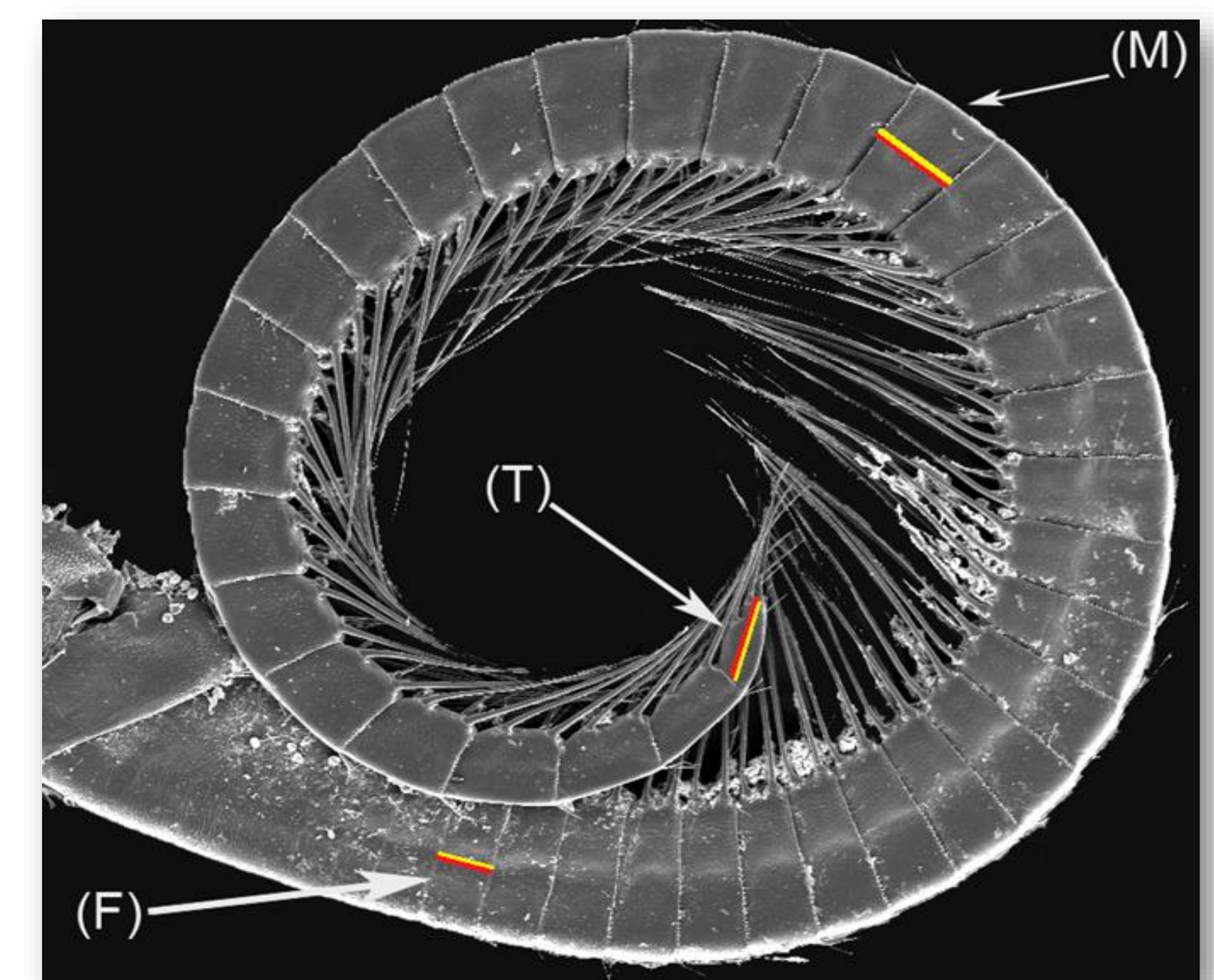


Figure 3: Longitudes de los segmentos primero (F), mediana (M) y terminal (T) medidas a la altura de la rama media a lo largo del eje longitudinal de la rama. Se utilizó el número de segmentos por cirros y la longitud presecaada (ajustada al tamaño corporal total) para el cálculo de los segmentos cm<sup>-1</sup>.

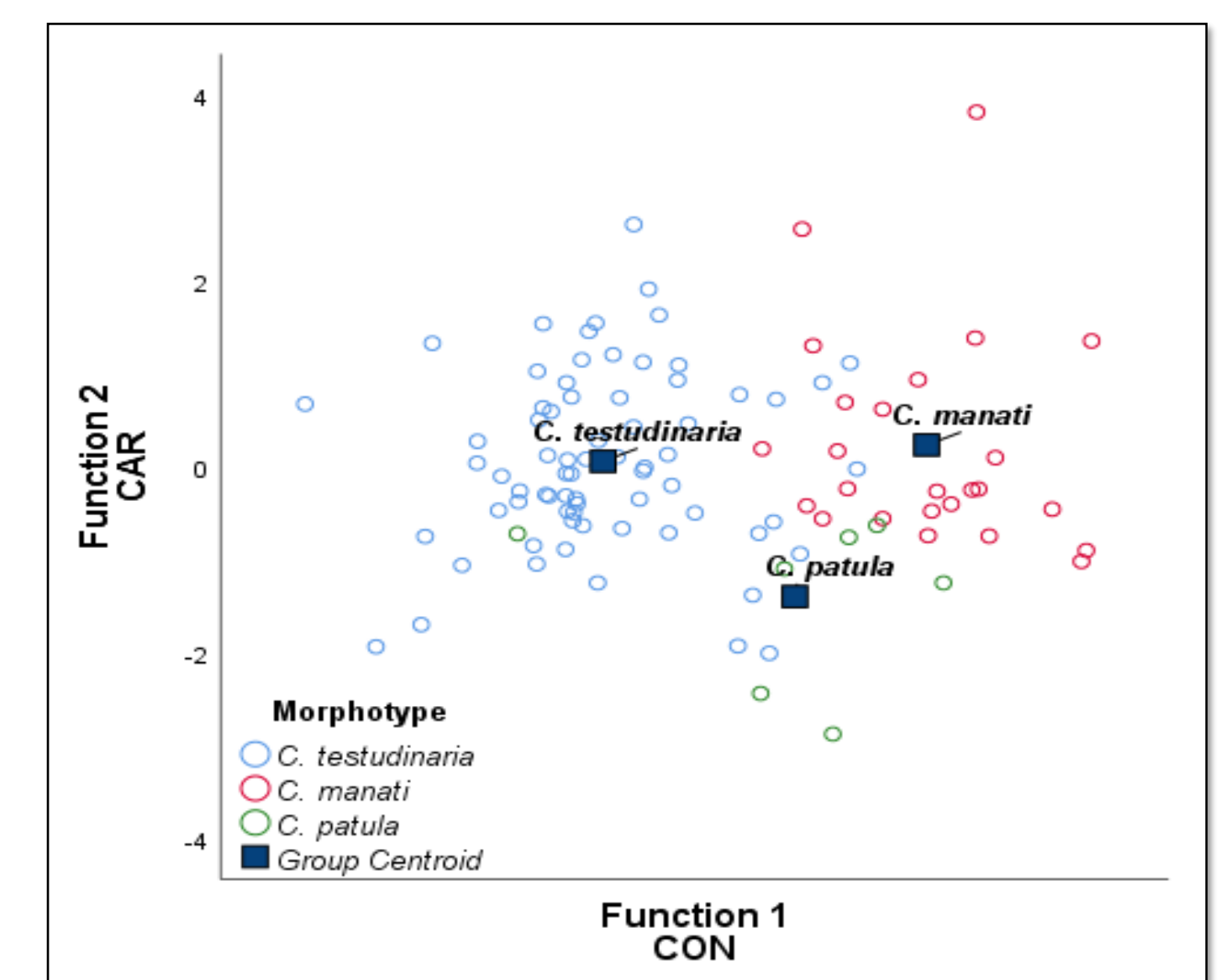


Figure 4: Resultados DFA con la incorporación de valores residuales para 9 factores ajustados por tamaño corporal utilizando la media geométrica. La función 1 (92% de varianza) se asoció negativamente con la conicidad (CON), mientras que la función 2 (8% de varianza) se asoció positivamente con la altura de la carina (CAR).

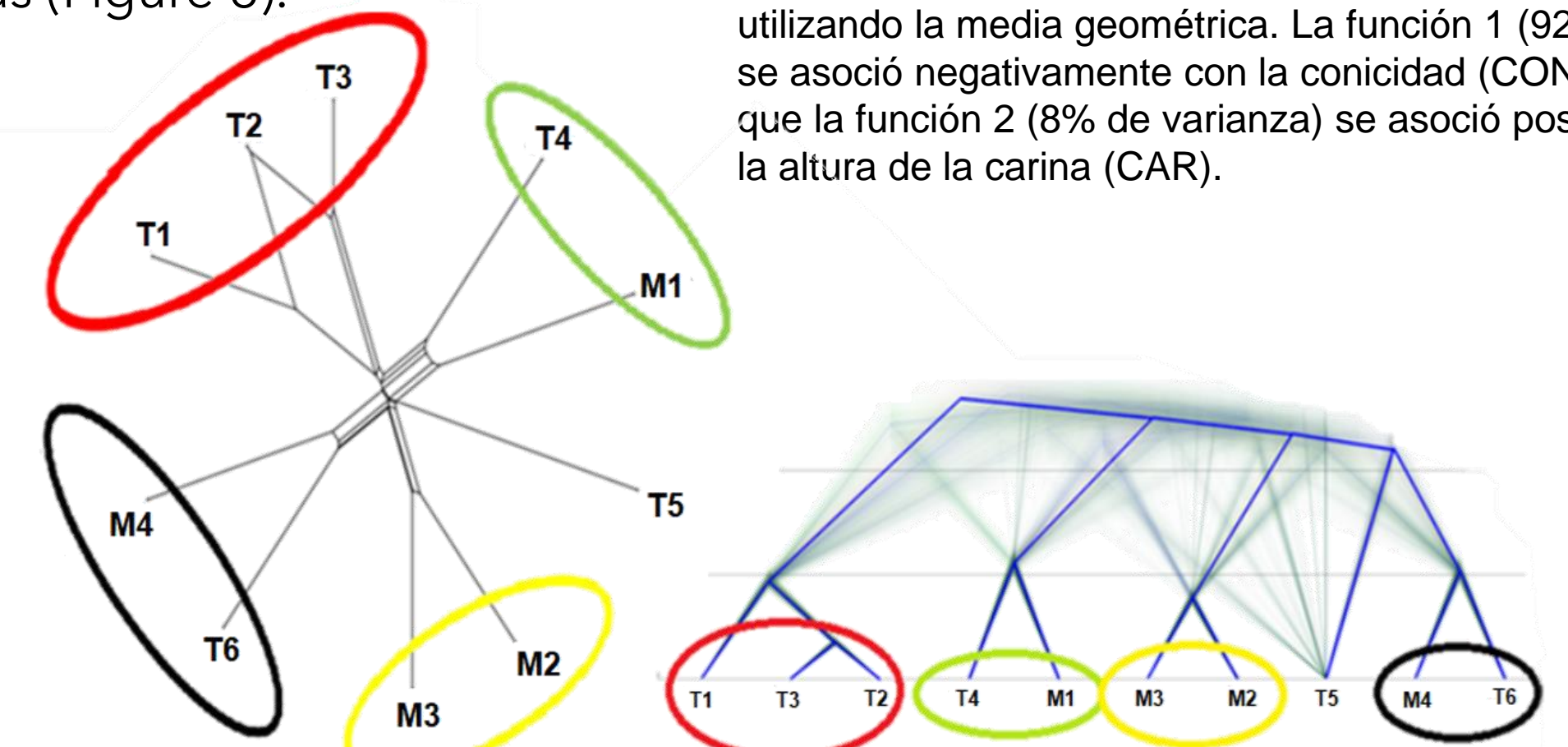


Figure 6: Loci concatenados (16s-28s-COI) (n = 10, 1526 bp). Comparación de clados identificados por SplitsTree análisis de red (izquierda) y BEAST máxima verosimilitud (derecha). Los grupos correspondientes se indican mediante el color del círculo compartido.

## REFERENCIAS

- Anderson, D.T. (1993). Barnacles: structure, function, development and evolution (Springer Science & Business Media).
- Darwin, C. (1854). The Balanidae, the Verrucidae, etc., Vol 2 (London: The Ray Society)
- Zardus, J.D., Lake, D.T., Frick, M.G., and Rawson, P.D. (2014). Deconstructing an assemblage of "turtle" barnacles: species assignments and fickle fidelity in *Chelonibia*. Marine biology 161, 45-59.
- Kitsos, M.-S., Christodoulou, M., Arvanitidis, C., Mavidis, M., Kirmizoglou, I., and Koukouras, A. (2005). Composition of the organismic assemblage associated with *Caretta caretta*. Journal of the Marine Biological Association of the UK 85, 257-261
- Hayashi, R., Chan, B.K., Simon-Blecher, N., Watanabe, H., Guy-Haim, T., Yonezawa, T., Levy, Y., Shuto, T., and Achituv, Y. (2013). Phylogenetic position and evolutionary history of the turtle and whale barnacles (Cirripedia: Balanomorpha: Coronuloidea). Molecular Phylogenetics and Evolution 67, 9-14.
- Mignucci-Giannoni, A.A., Beck, C.A., Montoya-Ospina, R.A., and Williams Jr, E.H. (1999). Parasites and commensals of the West Indian manatee from Puerto Rico. Skin 87812, 87812.87803
- Cheang, C.C., Tsang, L.M., Chu, K.H., Cheng, I.-J., and Chan, B.K. (2013). Host-specific phenotypic plasticity of the turtle barnacle *Chelonibia testudinaria*: a widespread generalist rather than a specialist. PLoS One 8, e57592.
- Frazier, J., and Margaritoulis, D. (1990). The occurrence of the barnacle, *Chelonibia patula* (Ranzani, 1818), on an inanimate substratum (Cirripedia, Thoracica). Crustaceana 59, 213-218.
- Sloan, K., Zardus, J.D., and Jones, M.L. (2014). Substratum fidelity and early growth in *Chelonibia testudinaria*, a turtle barnacle especially common on debilitated loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. Bulletin of Marine Science 90, 581-597.
- Cintrón-de Jesús, J. (2000). Barnacles associated with marine vertebrates in Puerto Rico and Florida (University of Puerto Rico, Mayagüez Campus).
- Amadon, D. (1949). The seventy-five per cent rule for subspecies. The Condor, 51(6), 250-258.

## CONCLUSIONES

- Los DFA mostraron diferencias morfológicas sustanciales entre los morfotipos de *Chelonibia*. Cada método DFA resultó en >80% de diferenciación entre los caracteres de prueba y cirrales de los tres morfotipos. Los individuos de *C. testudinaria* y *C. manati* exhibieron >85 % de discriminación recíproca, suficiente para subespecies según la regla del 75 %<sup>11</sup>.
- Las comparaciones SEM entre *C. testudinaria* y *C. manati* indicaron una diferenciación superior al 90 %, lo que agregó evidencia adicional para dilucidar mejor el grado de variación existente entre el asentamiento del huésped y la morfología dentro de *Chelonibia*.
- Los resultados de nuestro estudio sugieren que existe suficiente variación para separar *Chelonibia testudinaria* en subespecies en función de las medidas cuantitativas de los atributos externos, en lugar de los huéspedes de los que se recolectan los percebes, aunque las estimaciones de la divergencia molecular siguen sin ser concluyentes.

## AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a la Universidad de Loma Linda, el Departamento de Ciencias Biológicas y de la Tierra de LLU, el Grupo de Investigación Marina y ProTECTOR, Inc. por el apoyo y los recursos del proyecto. Obtuvimos especímenes a través de préstamos institucionales y aportes de colección de colaboradores de investigación. Gracias a Cathy Beck y al Servicio Geológico de EE. UU.; John Slapcinsky y el Museo de Historia Natural de la Universidad de Florida; Dr. Paul Larson y Corinne Fuchs de Florida FWRI, así como los Dres. Peter y Anne Meylan; y Eric Lazo-Wasem y Lourdes Rojas del Yale Peabody Museum por proporcionar especímenes.

