

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *STRAMONITA* DO LITORAL PAULISTA.

Camila Kaori Zacardi Hoshi de Lima¹, Juliana De Biasi², Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas, UMC; e-mail: camila.kzhl@yahoo.com.br

²Laboratório de Genética e Biologia de Peixes, UNESP, e-mail: jubbiasi@gmail.com

³Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br

Área do conhecimento: Genética

Palavras-chave: PCR-Multiplex; ITS; PRC-RFLP; COI; *Stramonita*.

INTRODUÇÃO

Na costa brasileira são citadas duas subespécies do gênero *Stramonita*: *S. haemastoma haemastoma* e *S. haemastoma floridana* (CONRAD, 1837). Na literatura estas se diferenciam morfológicamente pelo tamanho e ornamentação da concha (MATTHEWS, 1968) como possivelmente na anatomia interna.

De Biasi (2012) em trabalho recentemente realizado no litoral Paulista afirma a separação das duas subespécies em duas espécies congenéricas por meio de análises moleculares, comprovando que a espécie *S. brasiliensis* (antes apontada de *S. h. floridana*) é válida de acordo com Claremont *et al.*, (2011) e a espécie *S. haemastoma* (*S. h. haemastoma*) ainda possui problemas de identificação sendo chamada de *Stramonita sp.*

Conhecida popularmente como “saquarítá” no litoral paulista, possui valor econômico entre as comunidades litorâneas que a utilizam na alimentação e na pesca como isca (MANZONI& LACAVA, 1998; DE BIASI *et al.*, 2010). Muitas vezes é considerada praga por se alimentar de ostras e outros animais sésseis de interesse econômico (MIGLIOLI, 2000).

No Brasil, as informações sobre capturas de *Stramonita* são escassas, pois o gênero não aparece como categoria isolada nas estatísticas de produção pesqueira (SANTOS *et al.*, 2011).

O extrativismo sem a devida regulamentação da retirada das espécies para comercialização pode levar a redução das populações locais, o que de certa forma pode exaurir os recursos genéticos populacionais das espécies, enfatizando a necessidade de medidas de conservação.

Técnicas de identificação molecular das espécies por meio de marcadores moleculares são realizadas em diferentes regiões do genoma, tanto mitocondriais como nucleares. A utilização da técnica de PCR- Multiplex permite a rápida identificação de espécies através de padrões diferentes no tamanho dos *amplicons*, assim como a técnica onde se utiliza enzimas de restrição, PCR-RFLP. Sezaki *et al.*, (2005) utilizaram técnicas moleculares para distinguir duas espécies de enguias no intuito de evitar a exploração demasiada e consequentemente o desaparecimento de uma única espécie, já que as duas espécies possuem características externas imperceptíveis, e uma delas possui valor comercial elevado quando seu crescimento e tamanho são comparados.

Sendo assim, em face da importância deste táxon para a ecologia dos costões rochosos, bem como o uso deste recurso pela exploração extrativista, a identificação destas

espécies por meio de técnicas moleculares é pivotal para o adequado manejo das espécies e seu uso sustentado.

OBJETIVO

Identificar duas espécies: *Stramonita* sp. e *Stramonita brasiliensis* encontradas ao longo do litoral paulista utilizando técnicas moleculares com genes mitocondrial e nuclear.

METODOLOGIA

A extração de DNA foi realizada utilizando a musculatura da região do pé dos organismos seguindo o protocolo do kit Macherey-Nagel NucleoSpin[®] Tissue. Após a extração, as amostras foram avaliadas quanto à integridade e concentração de DNA e comparadas com o marcador molecular λ *Hind III* (ThermoScientific), por meio de gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA), corado com brometo de etídio (1mg/mL), fotografados sob luz UV.

Para amplificar os fragmentos mitocondriais correspondentes ao gene que codifica a região COI foram utilizados os iniciadores descritos para invertebrados, porém degenerados considerados iniciadores universais para ambas as subespécies (dgLCO 1490, dgHCO2198) descritos por Barco *et al.*, (2010). Através do programa NebCutter v.2.0, foi verificada as enzimas de restrição que poderiam ser utilizadas para fazer a identificação das espécies através de clivagens específicas para cada uma delas.

E para amplificar os fragmentos da região nuclear ITS, foram utilizados iniciadores universais (G-FOR e G-REV) descritos por Coleman e Vacquier, (2002). Os produtos da amplificação foram purificados através da enzima EXOSAP e levados para serem sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo e assim fazer a construção de iniciadores espécie específicos para cada uma das espécies estudadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a amplificação da região do DNA nuclear ITS, as amostras foram purificadas e enviadas para o sequenciamento no CEGH da Universidade São Paulo. O sequenciamento não demonstrou um grau de confiabilidade bom para a partir destas serem elaborados os iniciadores, isso pode ser devido à região ser composta por materiais genéticos tanto materno quanto fraterno, sendo assim novas amplificações e purificações foram feitas. Ao analisarmos o resultado de todos os sequenciamentos concluímos que as sequências não mostravam diferenças significativas para a construção de *primers* espécie específicos e as sequências mostraram estar ao fim da região 5.8S e início da região ITS2.

As amplificações com os iniciadores descritos por Barco *et al.*, (2010) foram satisfatórias, exibindo uma banda de aproximadamente 1000 pares de base

Foram escolhidas algumas enzimas de restrição para serem testadas: Cla I; Ase I; Taq I; Spe I; Fok I; Bam HI. Nla III; Ear I. Após este teste as amostras foram analisadas por meio de gel de agarose a 2%, que foi submetido a uma eletroforese horizontal sendo comparadas com um marcador de 100 pares de base. Os cortes enzimáticos com as enzimas de restrição Cla I; Ase I; Taq I; Fok I; Bam HI. Nla III; Ear I não resultaram em fragmentos específicos visíveis capazes de identificar as espécies. A tabela 1 mostra as sequências de nucleotídeos de cada sítio de reconhecimento das enzimas.

O resultado obtido foi com a enzima de restrição Spe I (BcuI), esta reconhece um sítio de clivagem na espécie *Stramonita brasiliensis*, diferenciando-a da outra espécie, uma vez que o fragmento da outra espécie não é clivado, permanecendo íntegro (Figura 1)

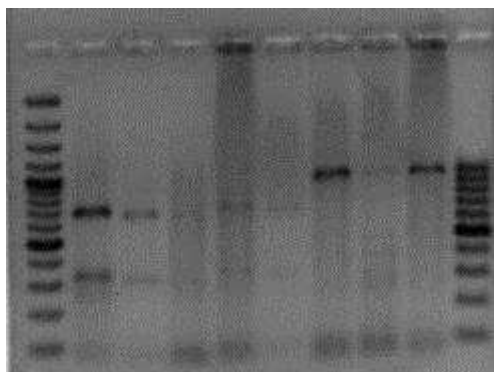


Figura 1: Gel de agarose 2%, eletroforese horizontal. 1ª Canaleta – marcador 100 pares de base *Invitrogen*; 2ª a 6ª Canaleta – amostras de *Stramonita brasiliensis*; 7ª a 9ª Canaleta – amostras de *Stramonitasp*; 10ª Canaleta – marcador 100 pares de base *ThermoScientific*.

O gene mitocondrial COI está sendo muito utilizado na diferenciação de espécies devido ao seu alto grau de desempenho em um fragmento relativamente pequeno, seu fácil alinhamento e também menos chances de sofrerem algum tipo de deleção e inserção (HEBERT *et al.* 2003).

Dentre as 8 enzimas testadas apenas uma foi eficiente, apesar de todas terem sido analisadas *in silico* anteriormente, tal problemática pode estar associada ao pequeno seguimento nucleotídico.

A *Stramonita* é um animal de interesse econômico para a comunidade litorânea, e quando abordada a questão da exploração extrativista, a identificação destas espécies ao longo dos costões rochosos é de extrema importância para estudos populacionais e ecológicos.

CONCLUSÕES

A técnica de PCR-RFLP foi bem sucedida quando se utiliza a enzima Spe I para fazer a diferenciação das espécies, tornando possível fazer a identificação molecular das espécies estudadas. Aplicação da técnica de PCR Multiplex não obteve resultados satisfatórios com a região nuclear ITS em razão de não haver regiões com diferença nucleotídica suficiente para construir *primers* espécie-específico para gerar bandas diagnósticas para cada espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE BIASI, J.B., TOMÁS, A.R.G., IMPARATO, I.; *Imposex em saquiritá Stramonita haemastoma (Neogastropoda: Muricidae) na Baixada Santista*. Bioikos.v.24, n.1, p.5-12, 2010.

DE BIASI, J.B. **Taxonomia Molecular, morfometria e morfologia de duas subespécies de *Stramonita haemastoma* (Mollusca, Gastropoda, Muricidae) do Litoral de São Paulo**. Tese de Mestrado. Laboratório de Organismos Aquáticos e Aquicultura. Universidade Mogi das Cruzes. 2012

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; de WARD, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes**. Proc. R. Soc. Lond., v. 270, p. 313-322. 2003.

MANZONI G. AND L. LACAVA. **Crescimento dos gastrópodes *Thais (Stramonita) haemastoma* e *Cymatium parthenoepum parthenoepum* cultivado experimental na**

ensenada da Armação do Itapocoroy (26 ° 47'S-48° 36'W) (PenhaSC). Notas Tec. FACIMAR. v. 2, p. 167-173. 1998.

MATTHEWS, H.R; Notas sobre o gênero *Thais* Roding, 1798 no Nordeste Brasileiro. Arq. Est. Biol. Marinha da Universidade Federal do Ceará. 8(1), p.37-41. 1968.

MIGLIOLI, M. A. Potencial de Crescimento da Concha de *Stramonita haemastoma* (L. 1767) (Gastropoda: Prosobranchia): Condições Ótimas e Restrições Naturais.2000.

SANTOS, JJB. e BOEHS, G.; Spatial-temporal distribution and recruitment of *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1758) (Mollusca) on a sandstone bank in Ilhéus, Bahia, Brazil. *Braz. J. Biol.* [online].vol.71, n.4, p.799-805. 2011.

SEZAKI, K.; ITOI, S.; WATABE, S.A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. Anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. Fisheries Science, v. 71, p.414–421, 2005.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida e as fundações FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e FAEP (Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa) pelo auxílio financeiro ao projeto.