

IDENTIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX DE DUAS ESPÉCIES DE STRAMONITA (MOLLUSCA, GASTROPODA, MURICIDAE) DO LITORAL DE SÃO PAULO.

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

Estudante do curso de Ciências Biológicas; camila.kzhl@yahoo.com.br¹
Co-orientadora Universidade de Mogi das Cruzes; jubbiasi@gmail.com²
Orientador Universidade de Mogi das Cruzes; wagner@umc.br³

Área do conhecimento: Biologia Molecular

Palavra-chave: PCR-Multiplex; 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 “saquarité” 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 sesséis 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*. 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

Desenvolver a técnica do PCR-Multiplex com a utilização do gene COI para diferenciar e identificar as duas espécies: *Stramonita* sp e *Stramonita brasiliensis* encontradas ao longo do litoral paulista.

METODOLOGIA

A extração de DNA foi realizada utilizando a musculatura da região do pé dos organismos seguindo o protocolo do kit Macherey-NagelNucleoSpin® 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) e dois iniciadores espécies-específicos para *Stramonita* sp (*SH1*- 5'CAACAAAAGGACTGCCGTAA3') e *S. brasiliensis* (*SF1*- 5' GGCAATGACCAAAAAGAAAATC3') descritos por De Biasi (2012).

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Gene Amp PCR System9700 AppliedBiosystems, com o seguinte ciclo: Passo 1 - 94°C por 3 minutos; Passo 2 - 94°C por 30 segundos; Passo 3 - 56°C por 40 segundos; Passo 4 - 72°C por 1 minuto; Passo 5 – voltar ao passo 2 e repetir por 30 vezes; Passo 6 – 72°C por 10 minutos; Passo 7 – 4°C por tempo infinito; Passo 8 – fim. A reação de PCR tinha um volume final de 10µl com os seguintes componentes: 1µl de DNA (molde); 1,25µl de dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP); 1,25 µl de Buffer 10X; 0,5 µl a 10 pmols de cada iniciador (*primer*); 0,7 µl a 2,5mM de cloreto de magnésio; 0,2 µl de enzima Taq; e 3,6 µl água MilliQ.

O produto da reação em cadeia da polimerase foi analisado em eletroforese utilizando gel de agarose a 2% tendo como referência um marcador GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes iniciais mostraram que os iniciadores SH1 e SF1 não amplificaram as amostras de DNA como esperado, então se fez necessário construir novos iniciadores espécie-específicos para ambas as espécies e fazer uma nova avaliação dos resultados. Os iniciadores foram construídos utilizando o programa *Primer 3 Input* (v.4,0) os mesmos foram avaliados quanto a sua integridade e qualidade pelo pacote *IDTS OligoAnalyzer 3.1*, (TABELA 1) com intenção de aumentar a diferença do número bases entre as duas espécies analisadas.

Tabela 1 - Iniciadores

Iniciador	Espécie	Sequência
SHAE 1	<i>Stramonita</i> sp.	5' GCTGTAGAAAGAGGGGTAGGT 3'
SHAE 2	<i>Stramonita</i> sp.	5' GTTGGTCCCGTTAATATTGGGGGCGC 3'
SHAE dg	<i>Stramonita</i> sp.	5' TGAACGCTTRCCTCTATTTGTATGRTC 3'
HAE F2	<i>Stramonita</i> sp.	5' GAGGGGTAGGTACAGGATGGA 3'
FLOR R	<i>Stramonita brasiliensis</i>	5' CCATCCTGTACCTACCCTCT 3'

Dentre todos os testes feitos com os novos iniciadores, os melhores resultados foram obtidos com o iniciador FLOR R em uma temperatura de anelamento de 56 °C, e com os iniciadores SHAE 2 e SHAE dg nas temperaturas de anelamento de 51 °C e 50 °C respectivamente.

Para melhorar os resultados das ampliações diferentes condições de temperatura (variação de 50°C à 56°C), e com diferentes concentrações de MgCl² (de 1,5mM à 3,0mM) , enzima Taq (U) e DNA foram testados, e mesmo assim os iniciadores SHAE 1, HAE F2 não foram eficazes para amplificar devidamente a região do gene mitocondrial.

As amostras foram submetidas a uma corrida de eletroforese com gel de agarose a 2% com o tampão TAE 1X, em uma velocidade de 90 Volts..

Contudo, não foi possível reproduzir estes resultados nas demais amostras de DNA extraídas, indicando que os iniciadores desenvolvidos não são específicos o suficiente para anelar a região dos iniciadores com a fita de DNA em todos os organismos.

CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos até o presente momento, novos testes deverão ser realizados no intuito de redefinir resultados satisfatórios e que possuam reprodutibilidade, assim, novos reagentes serão testados, além de modificações nas concentrações dos reagentes e na temperatura de anelamento para a amplificação das espécies deste trabalho, dentro de um mesmo teste de PCR-Multiplex. No decorrer do trabalho utilizando as modificações citadas avaliaremos a necessidade da construção de novos iniciadores universais com o intuito de diminuir os *amplicons* e torná-los mais reprodutíveis em todos os organismos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLAREMONT, M; Williams, S. T; Barraclough, T,G; Reid, D.G. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 6, p. 1016-1032. 2011.

DE BIASI, J.B., TOMÁS, A.R.G., IMPARATO, I.; ***Imposex em saugaritá *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

MANZONI G. AND L. LACAVA. **Crescimento dos gasterópodes *Thais (Stramonita) haemastoma* e *Cymatium parthenopheum parthenopheum* cultivo experimental na enseada 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 UMC 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.