

UTILIZAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR *ITS* NA IDENTIFICAÇÃO DE MOLUSCOS DA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ

Lara Darice Lima (PIC/UEM), Alessandra Valéria de Oliveira (Orientadora),
e-mail: avoliveira@uem.br. Thomaz Mansini Carrenho Fabrin (Co-orientador), e-mail: thomazmcf@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/CCB/Maringá, PR.

Genética, Genética Molecular e de Microorganismos

Palavras-chave: Alto rio Paraná, Gastrópodes, Identificação molecular.

Resumo:

A planície de inundação do alto rio Paraná se caracteriza por um ecossistema com grande biodiversidade, envolvendo vários organismos, dentre eles os moluscos. Por ser um filo diverso morfológicamente e com características semelhantes, a classificação se apresenta instável, tendo a nomenclatura repleta de sinônimas. Dentre algumas espécies de moluscos gastrópodes estão presentes potenciais hospedeiros intermediários de ciclos complexos de parasitos heteroxênicos. Alguns desses pertencem à subclasse Digenea (Trematoda) e tem como hospedeiro definitivo vertebrados, inclusive o homem. A identificação correta do molusco e do parasito se faz necessária uma vez que é importante compreender o ciclo parasitológico e as espécies nele envolvidas, tanto quanto a identificação de potenciais espécies invasoras. Uma das sequências utilizadas como marcador molecular para identificação é a região interna transcrita do gene ribossomal (*ITS*), que abrange as regiões *ITS1*, *5.8S* e *ITS2*. Dessa forma, o objetivo do trabalho visa a identificação das espécies de moluscos da planície de inundação do alto rio Paraná por meio de marcador molecular *ITS*. Esses moluscos podem estar sendo utilizados como hospedeiros intermediários de vários parasitas na região.

Introdução

Planícies de inundação são ecossistemas que oscilam entre períodos aquáticos e terrestres, o que resulta em uma variedade de interações e modificações dos organismos que vivem nesses locais, muitos apresentando adaptações nos dois ambientes (JUNK, 1997). A diversidade de espécies na planície de inundação do alto rio Paraná é abrangente, envolvendo diversos organismos como, por exemplo, os moluscos. Moluscos gastrópodes podem fazer parte de ciclos biológicos de parasitos heteroxênicos, atuando como hospedeiros intermediários. Alguns desses parasitos pertencem à subclasse Digenea (Trematoda) e tem como hospedeiro definitivo vertebrados, inclusive o homem (COELHO, 1995).

Os moluscos constituem um dos filos mais diversos no âmbito morfológico e a classificação de alguns organismos, em especial os da classe Gastropoda, tem se apresentado inconclusiva, necessitando de ferramentas de auxílio. Além disso há poucos profissionais taxonomistas desse grupo. Sobre essa perspectiva, identificar espécies de moluscos por meio de técnicas moleculares é importante para a compreensão das interações de vida existentes, devendo levar em consideração a presença de espécies hospedeiras do ciclo de parasitos e invasoras. Estudos moleculares em alguns gastrópodes atingiram resultado satisfatório, possibilitando a separação de espécies (CARVALHO et al., 2008).

Mutações no DNA geram polimorfismos distribuídos ao longo do genoma que podem ser detectados e explorados por marcadores moleculares, fornecendo inúmeras informações e permitindo o reconhecimento de espécies (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). A região interna transcrita (ITS) do DNA ribossomal é uma das sequências utilizadas como marcador molecular. Conforme Hillis (1991) o arranjo ITS consiste nas regiões *ITS1*, *5.8S* e *ITS2* do gene do rDNA nuclear, que estão entre as sequências mais versáteis para a análise filogenética. Assim, o trabalho visa a identificação das espécies de moluscos da planície de inundação do alto rio Paraná por meio do marcador molecular *ITS*.

Materiais e métodos

Os gastrópodes foram coletados na planície de inundação do alto rio Paraná, no primeiro semestre de 2020, durante as atividades do Projeto Ecológico de Longa Duração PELD-CNPq (Sítio 6), em parceria com o laboratório de Ictioparasitologia do Nupélia/UEM. Nesse período também foram realizadas coletas no Rio Ivaí, bacia do rio Paraná. Espécimes de moluscos coletados no Parque do Ingá (Maringá/PR) no segundo semestre de 2017 também foram utilizados nas análises. Todos espécimes tiveram suas conchas retiradas e foram triados no laboratório de Ictioparasitologia, em busca de parasitos digenéticos. Porções do tecido do pé dos espécimes foram retiradas e mantidas em tubos de 1,5ml contendo água Milli-Q para preservação e posterior extração do material genético.

A extração do DNA do tecido dos gastrópodes foi feita com o emprego do kit de extração de DNA Wizard Genomic DNA Purification da Promega, fundamentada nas instruções do fabricante. A amplificação dos fragmentos via PCR foi executada utilizando primers desenvolvidos para moluscos com função de amplificar regiões de interesse dos marcadores do rDNA nuclear *ITS* amplificada por meio dos *primers* ETTS1 e ITSF2, e do marcador mitocondrial *COI* com os *primers* LCO1490 e HCO2198. Em seguida, as amostras foram purificadas com polietilenoglicol (PEG) e enviadas para sequenciamento.

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas com o uso dos programas BioEdit e MEGA7, também utilizado para cálculo de distância. Todas as sequências editadas foram comparadas através da ferramenta Nucleotide

BLAST com dados depositados no GenBank em busca do grau de similaridade com sequências previamente disponíveis.

Resultados e Discussão

Foram obtidas sequências de DNA de sete gastrópodes, sendo dois pertencentes a planície de inundação do alto rio Paraná, dois ao rio Ivaí e três ao Parque do Ingá. As sequências do gene *COI* de espécimes da planície e do rio Ivaí apresentaram aproximadamente 500 pb e as amostras do parque do Ingá amplificadas com *ITS*, 400 pb. Os valores de similaridade entre as sequências obtidas e as sequências de bancos de dados estão representados na Tabela I. Os valores de distância genética entre os espécimes analisados variaram de zero a 40,3% com o *ITS* (Tabela II) e de 16,5% a 33,3% com o *COI* (Tabela III).

Tabela I. Valores de similaridade obtidos mediante a comparação de sequências de moluscos da bacia do alto rio Paraná, amplificadas com *ITS* e *COI*, com sequências do Genbank, utilizando a ferramenta BLASTn.

Espécime	Local de coleta	Marcador	BLAST	%
1	Parque do Ingá	<i>ITS</i>	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	100
2	Parque do Ingá	<i>ITS</i>	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	100
3	Parque do Ingá	<i>ITS</i>	<i>Pseudosuccinea columella</i>	100
4	Rio Ivaí	<i>COI</i>	<i>Felipponea iheringi</i>	90,60
5	Porto Rico	<i>COI</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>	94,12
6	Porto Rico	<i>COI</i>	<i>Planorbarius corneus/ Planorbella trivolvis</i>	98,63
7	Rio Ivaí	<i>COI</i>	<i>Bulimulus diaphanus</i>	87,61

Tabela II. Matriz de distância p (distância proporcional) de amostras de moluscos da bacia do alto rio Paraná amplificadas com marcador molecular *ITS*.

Espécies	1	2
1 <i>Biomphalaria occidentalis</i>		
2 <i>Biomphalaria occidentalis</i>	0,000000000	
3 <i>Pseudosuccinea columella</i>	0,4036458333	0,4036458333

Tabela III. Matriz de distância p de amostras de moluscos da bacia do alto rio Paraná amplificadas com marcador molecular *COI*.

Espécies	1	2	3
1 <i>Felipponea sp.</i>			
2 <i>Biomphalaria sp.</i>	0,2617449664		
3 Planorbidae	0,2885906040	0,1655480984	
4 <i>Bulimullus sp.</i>	0,3333333333	0,2416107383	0,2751677852

Os resultados revelaram a presença de animais ainda não registrados nas regiões amostradas da bacia do alto rio Paraná, sendo elas *Pseudosuccinea*

columella e o organismo da família Planorbidae. Entretanto, devido a porcentagem de similaridade relativamente baixa de algumas sequências do gene *COI*, em relação a sequências de organismos depositados em bancos de dados, análises adicionais deverão ser realizadas para confirmação de algumas espécies. Todos os gêneros incluem potenciais hospedeiros intermediários em ciclos de parasitas digenéticos, sendo *Pseudosuccinea* e *Planorbarius/Planorbella* não nativos da América do Sul.

Conclusões

A região nuclear *ITS* se mostrou útil na identificação molecular dos moluscos da bacia do alto rio Paraná a nível de espécie, apontando para 100% de similaridade de todas as nossas sequências com sequências de banco de dados. A região *COI* também se apresentou útil, entretanto o grau de similaridade menor com sequências de bancos de dados exige análises mais criteriosas desses organismos. A identificação e registro das espécies de moluscos analisadas é importante para o monitoramento ambiental nessas e em outras localidades onde se fazem presentes, sendo alguns invasores e potenciais hospedeiros intermediários de parasitos.

Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Ictioparasitologia do NUPELIA/UEM pelo auxílio na coleta e realização da triagem dos caramujos e ao Laboratório de Genética Molecular por disponibilizar materiais e reagentes para a realização do projeto.

Referências

- CARVALHO O.S., JANNOTTI-PASSOS L.K. & CALDEIRA R.L. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In: CARVALHO O. S., COELHO P. M. Z. & LENZI H.L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, p. 309-346.
- COELHO P. M. Z. Relação molusco/parasita: ciclo biológico do parasita no molusco. In: BARBOSA F. S. **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. p. 202-207.
- HILLIS D. M. & DIXON M. J. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453. 1991.
- JUNK W. J. **The Central Amazon floodplain**. Berlin: Springer, 1997.
- TURCHETTO C., TURCHETTO-ZOLET A. C., PASSAIA G. & ZANELLA C. M. Marcadores genéticos baseados em DNA. In: TURCHETTO-ZOLET A. C., TURCHETTO C., ZANELLA C. M. & PASSAIA G. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 12-20.