

VARIABILIDAD ESTRUCTURAL DEL GEN MITOCONDRIAL *16S-ARNr* EN POBLACIONES MISIONERAS DE *Omalonyx unguis* (SUCCINEIDAE: GASTROPODA)

Guzmán, L.B.^{1,2}

¹ Grupo de Investigación en Genética de Moluscos, Instituto de Biología Subtropical, CONICET – Universidad Nacional de Misiones, Rivadavia 2370, Posadas, Misiones, N3300LDX, Argentina

² División Zoología Invertebrados, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, La Plata, Buenos Aires, B1900FWA, Argentina

Email: leilaguzman95@gmail.com / leilaguzman@fceqyn.unam.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Omalonyx* d'Orbigny, 1837 (Succineidae) (del griego *omal* = plano o achatado y *onyx* = uña o garra) forman parte del gran grupo de gasterópodos pulmonados que habitan la Argentina (Fernández, 1973; Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2013). Su distribución abarca centro y sur de América, e islas del Caribe (Barker, 2001; Arruda & Thomé, 2008). Generalmente, se encuentran asociados a zonas de vegetación próxima a cuerpos de agua o sobre macrófitas flotantes (Barker, 2001; Arruda & Thomé, 2008; García *et al.*, 2012). Para la Provincia de Misiones, Argentina se registran unas 140 especies de moluscos continentales, entre las que se incluyen miembros del género *Omalonyx* d'Orbigny, 1837 (Rumi *et al.*, 2006, 2008; Núñez *et al.*, 2010; Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2013). De acuerdo con modelos de distribución potencial, Misiones se indica como área probable de distribución de las especies *O. unguis*

(d'Orbigny, 1837) y *O. convexus* (Heynemann, 1868) (Coscarelli *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta hace unos pocos años se desconocía la identidad de las poblaciones de este género registradas en la provincia, confirmándose en 2018 la presencia de *O. unguis* en arroyos aledaños a la ciudad de Posadas (Guzmán *et al.*, 2018a).

A la fecha, los estudios genéticos en *Omalonyx* se han realizado principalmente para explorar la diversidad genética de sus poblaciones y valorar las especies del grupo en el marco de estudios taxonómicos (Vidigal *et al.*, 2018). Para el género, actualmente se encuentran disponibles en *GenBank* unas 158 secuencias de ADN correspondientes a los marcadores *cox1*, *18S-ARNr*, *cyt b*, *ITS2* y *16S-ARNr*, de las cuales solo unas pocas secuencias corresponden a especímenes de la Argentina. Por otra parte, del listado de marcadores mencionados, los genes ribosomales resultan de particular interés para elucidar la historia evolutiva

del grupo por ser blanco frecuente de eventos de inserción/delección, que permiten valorar el polimorfismo de secuencia con base en su estructura secundaria (Ramirez & Ramírez, 2010).

Con el fin de aportar conocimiento sobre la variabilidad genética del género en la Argentina, en este trabajo se presentan nuevas secuencias para el gen *16S-ARNr* a partir especímenes misioneros de *Omalonyx unguis*, así como un análisis estructural de la variabilidad genética, mapeada sobre el modelo de estructura secundaria disponible para la familia Succineidae.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los especímenes incluidos en este estudio fueron recolectados sobre la margen de los arroyos Garupá y Zaimán, en el sur de la Provincia de Misiones (Fig. 1). La inspección morfo-anatómica del sistema reproductor de los individuos se realizó siguiendo principalmente a Arruda (2011), Coscarelli & Vidigal (2011) y Guzmán *et al.* (2018a). La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de una porción del músculo pedal de cada individuo, empleando un protocolo CTAB estandarizado para gasterópodos (Beltramino *et al.*, 2018). La amplificación de la región parcial del gen *16S-ARNr* se realizó mediante

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores 16SF-104 y 16SR-472 (Ramirez & Ramírez, 2010). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 30 μ l, conteniendo 30–50 ng de ADN, 1X buffer de reacción, 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, cada cebador a 0,2 μ M y 1,25 U de *Taq Pegasus ADN* Polimerasa (Productos Bio-Lógicos). La amplificación se realizó en un termociclador T18 (Ivema Desarrollos) bajo el siguiente perfil térmico: 35 ciclos de 94 °C (30 segundos), 48 °C (30 segundos), 72 °C (1 minuto) y una extensión final de 72 °C durante 1 minuto. Los amplicones se purificaron mediante un kit *AccuPrep PCR Purification Kit* (Bioneer) y se enviaron a MacroGen (Corea) para su secuenciación automática en ambos sentidos. Las secuencias de ADN fueron editadas y depositadas en *GenBank* (números de acceso: MN581915 a MN581921).

Para evaluar el polimorfismo en el material de estudio, las secuencias fueron alineadas usando *LocARNA* (Will *et al.*, 2012) y contrastadas con las secuencias disponibles en *GenBank* mediante el algoritmo *BLASTn*. El número de haplotipos en la muestra fue inferido a través del programa *DNAsp* (Rozas *et al.*, 2017). Finalmente, se generó un modelo de estructura secundaria para los dominios IV y V del

gen *16S-ARNr* para *O. unguis* mediante comparación directa con el modelo de referencia para la familia Succineidae (Guzmán *et al.*, 2018b), sobre el cual se mapeó el polimorfismo de secuencia obtenido.

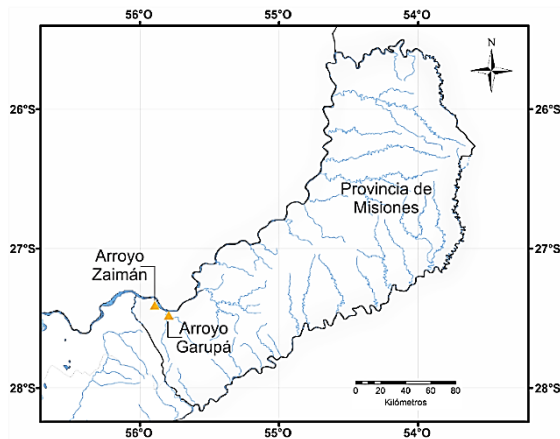


Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Omalonyx unguis* analizadas en el presente estudio.

RESULTADOS

Se recolectaron y analizaron un total de siete individuos de *Omalonyx* sp., cinco provenientes del Arroyo Garupá y dos del Arroyo Zaimán, Misiones, Argentina (Tabla 1). Anatómicamente, los individuos se

identificaron como *Omalonyx unguis* por la presencia de caracteres morfológicos típicos de la especie en concordancia con lo descrito por Arruda (2011), Coscarelli & Vidigal (2011) y Guzmán *et al.* (2018a).

Las secuencias parciales del gen *16S-ARNr* obtenidas en este estudio presentaron un tamaño en el rango de 255-259 pb. La longitud total del alineamiento de secuencias fue de 260 pb. Se identificaron un total de seis haplotipos y ocho posiciones variables, de las cuales siete se trataron de mutaciones del tipo *indel* (Tabla 2). La comparación de estos haplotipos contra la base de datos de *GenBank* mediante *BLASTn* evidenció valores de identidad en el rango del 98,06-99,61% de similitud (con cobertura del 100%) en relación con una secuencia de *O. unguis* disponible para el Arroyo Garupá (MG459423). La estructura secundaria y sus posiciones variables se muestran en la Fig. 2.

Tabla 1. Registros de *Omalonyx unguis* obtenidos en el presente trabajo.

N°	Localidad	# Voucher	Latitud	Longitud	# GenBank 16S-ARNr
1	Arroyo Garupá	IBS-Ma 073-1	27,478611°S	55,793333°O	MN581915
2	Arroyo Garupá	IBS-Ma 073-2	27,478611°S	55,793333°O	MN581916
3	Arroyo Garupá	IBS-Ma 073-3	27,478611°S	55,793333°O	MN581917
4	Arroyo Garupá	IBS-Ma 073-4	27,478611°S	55,793333°O	MN581918
5	Arroyo Garupá	IBS-Ma 073-5	27,478611°S	55,793333°O	MN581919
6	Arroyo Zaimán	IBS-Ma 074-1	27,406111°S	55,893889°O	MN581920
7	Arroyo Zaimán	IBS-Ma 074-2	27,406111°S	55,893889°O	MN581921

IBS-Ma: Colección Malacológica del Instituto de Biología Subtropical, CONICET-Universidad Nacional de Misiones.

Tabla 2. Posiciones polimórficas del gen *16S-ARNr* para los haplotipos de *Omalonyx unguis* del sur de la Provincia de Misiones.

	100	136	146	147	148	149	191	198
MN581917	–	T	T	T	T	T	–	C
MN581916	–	.	–	–	–	–	A	.
MN581918	–	.	–	–	–	–	A	.
MN581920	–	A	.
MN581915	–	.	.	–	–	–	A	T
MN581919	–	–	–	.
MN581921	A	.	.	–	–	–	A	T

En números se indican las posiciones variables. MN581917 fue elegida como secuencia de referencia. Los puntos indican identidad con la secuencia de referencia y los guiones indican *indels*.

DISCUSIÓN

En un esfuerzo para ampliar el conocimiento sobre el *background* genético de *Omalonyx unguis* en la Argentina, en este trabajo se generaron siete nuevas secuencias del marcador mitocondrial *16S-ARNr*. Antes de este estudio, solo se contaba en *GenBank* con una única secuencia de este marcador para todo el género, correspondiente a un individuo de *O. unguis* proveniente del Arroyo Garupá, Misiones, Argentina (Guzmán *et al.*, 2017).

A pesar del bajo número de secuencias analizadas, en este trabajo se documentó polimorfismo de secuencias, con ocho posiciones variables sobre un alineamiento de 260 pb, que reflejan niveles de variabilidad genética relativamente altos en el material de estudio. Este nivel de polimorfismo sugiere que el gen *16S-ARNr* representaría un buen marcador

molecular para estudios poblacionales futuros dentro de *O. unguis*, no solo por tratarse de una región ampliamente utilizada en estudios de moluscos (Standley *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2016; Varney *et al.*, 2016; Fernández-Pérez *et al.*, 2017), sino también por la disponibilidad de cebadores universales (Ramírez & Ramírez, 2010) y su fácil secuenciación (Krakowetz *et al.*, 2010; Vélez *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2013). Sin embargo, a fin de confirmar su utilidad, son requeridos mayores estudios con un incremento en el número de individuos y poblaciones analizadas.

Por otra parte, si bien las secuencias de los genes ribosomales comúnmente sufren mutaciones, funcionalmente se prioriza la conservación de su estructura secundaria por sobre la secuencia primaria de nucleótidos, debido al rol fundamental de estos genes en la síntesis proteica (Springer & Douzery,

1996; Wang & Lee, 2002; Domingues de Oliveira, 2017). En este sentido, las mutaciones caracterizadas en este trabajo se concentraron completamente en regiones de bucles, dando cuenta de un mantenimiento de la estabilidad estructural de la molécula. Debido a que diversos autores destacan una mejora en los resultados de estudios filogenéticos al involucrar la estructura secundaria de los genes ribosomales en sus alineamientos (Wang & Lee, 2002; Subbotin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Keller *et al.*, 2010), para lo cual es necesario disponer de un modelo estructural, se espera que los resultados obtenidos en este trabajo sirvan de base para futuros estudios poblacionales en *Omalonyx*, así como en la familia Succineidae.

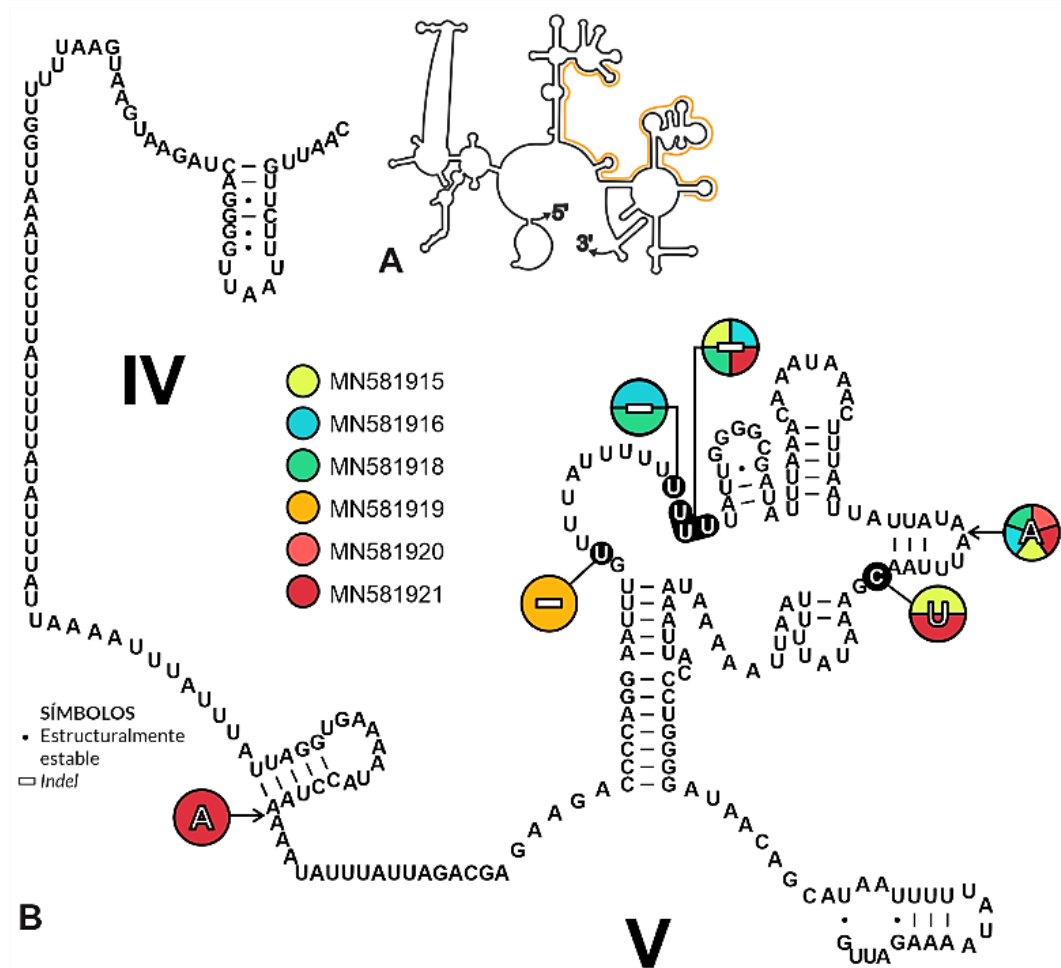


Figura 2. Estructura secundaria de los dominios IV y V del gen *16S-ARNr* de *Omalonyx unguis*. **A.** Representación esquemática de la estructura secundaria del gen *16S-ARNr* para moluscos; en color se indica la región amplificada en este estudio. **B.** Modelo estructural para la especie propuesto aquí; en globos de colores se indica el polimorfismo de secuencia a partir de los especímenes analizados.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Argentina de Malacología (ASAM) por otorgarme el Premio Parodiz – Estudiante de Grado 2018 que permitió financiar parte del presente estudio. También agradezco al Dr. Ariel A. Beltramino y el Dr. Roberto E. Vogler por su orientación, lectura y valiosos aportes al manuscrito. Finalmente, a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – Universidad Nacional de Misiones (Proyecto de Investigación 16Q1227-PI).

REFERENCIAS

- ARRUDA JO (2011) Revisão taxonômica e análise cladística de *Omalonyx* d'Orbigny, 1837 (Mollusca, Gastropoda, Succineidae). Tesis Doctoral. Porto Alegre. 131 p.
- ARRUDA JO & THOMÉ JW (2008) Revalidation of *Omalonyx convexus* (Heynemann 1868) and emendation of the type locality of *Omalonyx unguis* (Orbigny 1837) (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Succineidae). *Archiv für Molluskenkunde* 137: 159–166.
- BARKER GM (2001) Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. En: Barker GM (ed.). *The biology of terrestrial mollusks*. CABI Publishing, New York. pp. 1–146.
- BELTRAMINO AA, VOGLER RE, RUMI A, GUZMÁN LB, MARTÍN SM & PESO JG (2018) The exotic jumping snail *Ovachlamys fulgens* (Gude, 1900) (Gastropoda: Helicarionidae) in urban areas of the Upper Paraná Atlantic Forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90: 1591–1603.
- COSCARELLI D, MONTRESOR LC, RUSSO P, MELO AL & VIDIGAL THDA (2018) Predicting the distribution of *Omalonyx* (Mollusca: Pulmonata: Succineidae) species from literature review, museum databases and new sampling efforts in Brazil. *Biota Neotropica* 18: e20170409.
- COSCARELLI D & VIDIGAL THDA (2011) Mollusca, Gastropoda, Succineidae, *Omalonyx unguis* (d'Orbigny, 1835): distribution extension and new records for Brazil. *Check List* 7: 400–403.
- DOMINGUES DE OLIVEIRA EH (2017) RNA ribosomal (rRNA). En: Campos Pereira T (ed.). *Introdução ao universo dos non-coding RNAs*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. pp. 37–39.
- FERNÁNDEZ D (1973) Catálogo de la malacofauna terrestre argentina. Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires. La Plata. 197 p.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ J, FROUFE E, NANTÓN A, GASPAR MB & MÉNDEZ J (2017) Genetic diversity and population genetic analysis of *Donax vittatus* (Mollusca: Bivalvia) and phylogeny of the genus with mitochondrial and nuclear markers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 197: 126–135.
- GARCÍA MVB, ARRUDA JO, PIMPÃO DM & GARCIA TB (2012) Ocorrência e controle de lesmas do gênero *Omalonyx* (Gastropoda, Succineidae), pragas de capim-elefante *Pennisetum purpureum*

- (Poaceae) em Rio Preto da Eva, Amazonas. *Acta Amazônica* 42: 227–230.
- GUO BY, YE YY, LI JJ, QI PZ, LV ZM, GUAN A & WU C (2016) Genetic diversity and population structure of *Sepiella japonica* (Mollusca: Cephalopoda: Decapoda) inferred by 16S rDNA variations. *Aquaculture Research* 47: 3016–3022.
- GUTIÉRREZ GREGORIC DE, NÚÑEZ V, VOGLER RE, BELTRAMINO AA & RUMI A (2013) Gasterópodos terrestres de la provincia de Misiones, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 61: 1759–1768.
- GUZMÁN LB, VOGLER RE, BELTRAMINO AA & PESO JG (2017) Marcadores moleculares en *Omalonyx unguis* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda: Succineidae), con un nuevo registro en la Provincia Malacológica Misionera. En: X Congreso Latinoamericano de Malacología. Piriápolis. Uruguay.
- GUZMÁN LB, SERNIOTTI EN, VOGLER RE, BELTRAMINO AA, RUMI A & PESO JG (2018a) First record of the semi-slug *Omalonyx unguis* (d'Orbigny, 1837) (Gastropoda, Succineidae) in the Misiones Province, Argentina. *Check List* 14: 705–712.
- GUZMÁN LB, SERNIOTTI EN, VOGLER RE, BELTRAMINO AA, RUMI A & PESO JG (2018b) Secondary structure of the partial mitochondrial large ribosomal subunit of *Omalonyx unguis* (d'Orbigny, 1837) (Gastropoda, Succineidae). En: XXII International Congress of Genetics. Foz do Iguaçu. Brasil.
- KELLER A, FÖRSTER F, MÜLLER T, DANDEKAR T, SCHULTZ J & WOLF M (2010) Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *Biology Direct* 5: 4.
- KRAKOWETZ CN, DERGOUSOFF SJ & CHILTON NB (2010) Genetic variation in the mitochondrial 16S rRNA gene of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Vector Ecology* 35: 163–173.
- LI J, WANG X, KONG X, ZHAO X, HE S & MAYDEN RL (2008) Variation patterns of the mitochondrial 16S rRNA gene with secondary structure constraints and their application to phylogeny of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 472–487.
- NÚÑEZ V, GUTIÉRREZ GREGORIC DE & RUMI A (2010) Freshwater gastropods provinces from Argentina. *Malacologia* 53: 47–60.
- QI P, GUO B, XIE C, WU C, LU S, DUAN Y & ZHOU X (2013) Assessing the genetic diversity and population structure of *Culter alburnus* in China based on mitochondrial 16S rRNA and COI gene sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* 50: 390–396.
- RAMIREZ J & RAMÍREZ R (2010) Analysis of the secondary structure of mitochondrial LSU rRNA of Peruvian land snails (Orthalicidae: Gastropoda). *Revista Peruana de Biología* 17: 053–057.
- ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, GUIRAO-RICO S, LIBRADO P, RAMOS-ONSINS SE & SÁNCHEZ-GARCÍA A (2017) DnaSP v6:

- DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299–3302.
- RUMI A, GUTIÉRREZ GREGORIC DE, NÚÑEZ V, CESAR II, ROCHE MA, TASSARA MP, MARTÍN SM & LÓPEZ ARMENGOL MF (2006) Freshwater Gastropoda from Argentina: species richness, distribution patterns, and an evaluation of endangered species. *Malacologia* 49: 189–208.
- RUMI A, GUTIÉRREZ GREGORIC DE, NÚÑEZ V & DARRIGRAN G (2008) Malacología latinoamericana. Moluscos de agua dulce de la República Argentina. *Revista de Biología Tropical* 56: 77–111.
- SPRINGER MS & DOUZERY E (1996) Secondary structure and patterns of evolution among mammalian mitochondrial 12S rRNA molecules. *Journal of Molecular Evolution* 43: 357–373.
- STANDLEY CJ, GOODACRE SL, WADE CM & STOTHARD R (2014) The population genetic structure of *Biomphalaria choanomphala* in Lake Victoria, East Africa: implications for schistosomiasis transmission. *Parasites & Vectors* 7: 524.
- SUBBOTIN SA, STURHAN D, VOVLAS N, CASTILLO P, TAMBE JT, MOENS M & BALDWIN JG (2007) Application of the secondary structure model of rRNA for phylogeny: D2–D3 expansion segments of the LSU gene of plant-parasitic nematodes from the family Hoplolaimidae Filipjev, 1934. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 881–890.
- VARNEY RL, SACKETT RE & WILBUR AE (2016) Analysis of spatiotemporal genetic variability in eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) MtDNA 16S sequences among North Carolina populations. *Journal of Shellfish Research* 35: 329–342.
- VIDIGAL THDA, COSCARELLI D, PAIXÃO H, BERNARDES S, MONTRESOR LC & PEPATO AR (2018) Integrative taxonomy of the neotropical genus *Omalonyx* (Elasmognatha: Succineidae). *Zoologica Scripta* 47: 174–186.
- VÉLEZ S, MESIBOV R & GIRIBET G (2012) Biogeography in a continental island: population structure of the relict endemic centipede *Craterostigma tasmanianus* (Chilopoda, Craterostigmomorpha) in Tasmania using 16S rRNA and COI. *Journal of Heredity* 103: 80–91.
- WANG HY & LEE SC (2002) Secondary structure of mitochondrial 12S rRNA among fish and its phylogenetic applications. *Molecular Biology and Evolution* 19: 138–148.
- WILL S, JOSHI T, HOFACKER IL, STADLER PF & BACKOFEN R (2012) LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs. *RNA* 18: 900–914.