

ADAPTAÇÃO METODOLÓGICA DE CITOGENÉTICA PARA MINHOCAS

TIMM, Vítor Falchi¹; ROCHA, Marla Piumbini¹; ZEFA, Edison²; SCHIEDECK, Gustavo³

¹ *Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Morfologia. E-mail: vítor.timm@hotmail.com; marlapi@yahoo.com.br*

² *Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia e Genética. E-mail: edzefa@gmail.com*

³ *Embrapa Clima Temperado. E-mail: gustavo.schiedeck@cpact.embrapa.br*

1- INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que apresenta uma diversidade enorme de espécies de minhocas. Segundo Brown e James (2007), existem aproximadamente 305 espécies/subespécies de minhocas, das quais 85% são nativas e 15% são exóticas. Dentre estas, está a espécie *Eisenia andrei*.

Segundo Domínguez (2004), as espécies *E. andrei* Bouché e *E. fetida* Savigny são muito utilizadas para manejo de resíduos orgânicos e estudos ecotoxicológicos por se adaptarem facilmente a diferentes ambientes, serem de fácil criação em cativeiro, apresentarem uma grande distribuição regional e terem ciclo de vida curto. Entretanto, essas duas espécies são muito semelhantes em sua morfologia externa, o que acaba dificultando a identificação da espécie (DOMÍNGUEZ et al., 2005).

A citogenética fornece dados que colaboram para a identificação e diferenciação de espécies, uma vez que está baseada em características dos cromossomos (WHITE, 1973). Os primeiros dados citogenéticos de minhocas publicados datam da metade do século XX (MULDAL, 1952; BULATOVA et al., 1987), mas ainda não há uma técnica padronizada para obtenção de cromossomos em metáfase, com cada autor utilizando metodologias diferenciadas.

O objetivo do presente trabalho foi testar diferentes técnicas citogenéticas em minhocas da espécie *Eisenia andrei* Bouché, no intuito de estabelecer uma diretriz para novos estudos que proporcionem a obtenção de material com maior número de metáfases com menos custo e tempo de desenvolvimento.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

Para obtenção de cromossomos mitóticos metafásicos foram testadas quatro regiões do corpo da minhoca: vesícula seminal (BAKHTADZE et al, 2008, GARBAR et al. 2009), intestino, compreendendo da boca até o início do clitelo (BAKHTADZE et al, 2008, HONGELL & TERHIVUO, 1989), região do clitelo (HONGELL & TERHIVUO, 1989, BAKHTADZE et al, 2008) e a região da cauda (SHEN et al 2011), sendo que, nas 24h anteriores à dissecação, os segmentos terminais foram amputados.

Foram testadas duas concentrações de colchicina, 0,05% e 0,5%, sendo essa droga injetada 24 horas antes da dissecação (SHEN et al 2011, GARBAR & VLASENKO, 2007). Após a dissecação, os órgãos ficaram incubados em solução hipotônica por um tempo variando de 1 a 24 horas.

Para o processo de fixação do material, foram testados três diferentes fixadores: i) ácido acético 45%, ii) uma combinação de três fixadores com ordem crescente de concentração de ácido acético (fixador 1: 1 mL de ácido acético/1,5 mL

de etanol/2 mL de água destilada, fixador 2: 1 mL de ácido acético/1,5 mL de etanol, fixador 3: ácido acético 100%) e **iii**) Carnoy (GARBAR et al. 2009, GARBAR & VLASENKO, 2007).

Os órgãos foram esmagados e corados com orceina ou dissociados e corados com Giemsa (KASHMENSKAYA & POLYAKOV, 2008, HONGELL & TERHIVUO, 1989, VITTURI et al 2000, SHEN et al 2011).

O material foi observado em microscópio óptico e o número de metáfases foi contabilizado por região.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região que apresentou o maior número de metáfases foi a região caudal (Tab.1). O número de metáfases utilizando 0,05% de colchicina foi baixo, sendo obtidos melhores resultados com a concentração de 0,5%. O tempo na colchicina no organismo de no mínimo 24 horas apresentou melhores resultados. O tempo de solução hipotônica ideal foi de 3 a 5 horas. O fixador que melhor se adequou foi o que apresentou concentração crescente de ácido acético (ii).

Tabela 1 - Número de cromossomos metafásicos observados nos diferentes órgãos de *Eisenia andrei* utilizando concentração de colchicina 0,5%, tempo de atuação da colchicina de 24 horas e tempo de hipotonização de 4 horas.

Região ou órgão	Número de metáfases	
	Repetição 1	Repetição 2
Vesícula	2	0
Intestino	2	0
Região do Clitelo	0	2
Últimos segmentos	29	34

Apesar de não ter sido objeto do estudo, o metabolismo da minhoca provavelmente afete o número de divisões celulares, pois se verificou que as minhocas que apresentaram maior metabolismo, ou seja, maior movimentação ao serem tocadas e corpo firme, apresentavam maior número de metáfases que as minhocas com pouco movimento e corpo com pouca resistência.

Em alguns indivíduos foram encontrados nematóides e bactérias, mas a presença desses organismos não afetou o número de metáfases.

4- CONCLUSÃO

A região do corpo utilizada, a concentração de colchicina, o tempo de imersão em solução hipotônica e a técnica de fixação são fatores a ser considerados na obtenção de cromossomos metafásicos de *Eisenia andrei* Bouché. A partir desses resultados, novos estudos serão realizados para um maior detalhamento dessas variáveis e suas interações nas respostas avaliadas.

5- REFERÊNCIAS

BAKHTADZE, N. G.; BAKHTADZE, G. I.; KVAVADZE, E. Sh. The chromosome numbers of Georgian earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 2, n. 1, p. 79-83, 2008.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. **Minhocas na América Latina: biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja. 2007.

BULATOVA, N.; PEREL, T. S.; GRAPHODATSKY, A. S. Constancy of the chromosome set in polyploid earthworms with special reference to *Eisenia nordenskiöldi* (Oligochaeta, Lumbricidae). **Bollettino di Zoologia**, v. 4, p. 289-291, 1987.

DOMÍNGUEZ, J. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. In: EDWARDS, C. A. (ed). **Earthworm Ecology** (2 ed.). Boca Ratón: CRC Press, p. 401-424, 2004.

DOMÍNGUEZ, J.; VELANDO, A.; FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? **Pedobiologia**, v. 49, p. 81-87, 2005.

GABAR, A. V.; ONYSCHUK, I. P.; MEZHHERIN, S. V. Polyploid races. Genetic structure and morphological features of the earthworm *Octodrilus transpadanus* (Rosa, 1884) (Oligochaeta: Lumbricidae) in the Ukraine. **Comparative Cytogenetics**, v. 3, n. 2, p. 131-141, 2009.

GABAR, A. V.; VLASENKO, R. P. Karyotype of three species of the genus *Aporrectodea* Örley (Oligochaeta: Lumbricidae) from the Ukraine. **Comparative Cytogenetics**, v. 1, n. 1, p. 59-62, 2007.

HONGEL, K.; TERHIVUO, J. Chromosomal status of the parthenogenetic earthworm *Dendrobaena octaedra* (Sav.) (Oligochaeta: Lumbricidae) in southern Finland. **Hereditas**, v. 110, p. 179-182, 1989.

KASHMENSKAYA, M. N.; POLYAKOV, A. V. Karyotype analysis of five species of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 2, n. 2, p. 121-12, 2008.

MULDAL, S. The chromosomes of the earthworms I. The evolution of polyploidy. **Heredity**, v. 6, p. 55-76, 1952.

SHEN, H.; TSAI, C.; FANG, Y.; CHEN, J. Parthenogenesis, polyploidy and reproductive seasonality in the Taiwanese mountain earthworm *Amyntas catenus*. **Pedobiologia**, v. 54, p. 133-139, 2011.

VITTURI, R.; COLOMBA, M. S.; PIRRONE, A.; LIBERTINI, A. Physical mapping of rDNA genes, (TTAGGG)_n telomeric sequence and other karyological features in two earthworms of the family Lumbricidae (Annelida: Oligochaeta). **Heredity**, v. 85, p. 203-207, 2000.

WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution.** Cambridge University Press, London. 1973.