UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho de Conclusão de Curso

Análise citogenética e histológica de espécies de minhocas encontradas na região de Pelotas

Vítor Falchi Timm

Pelotas, 2015

Vítor Falchi Timm

Análise citogenética e histológica de espécies de minhocas encontradas na região de Pelotas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Pesq. Dra. Marla Piumbini Rocha

Coorientador: Dr. Gustavo Shiedeck

Coorientador: Prof. Dr. Edison Zefa

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz V. Vieira – CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T584a Timm, Vítor Falchi
Análise citogenética e histológica de espécies de minhocas encontradas na região de Pelotas / Vítor Falchi Timm. – 30f.; il. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientador Marla Piumbini Rocha; co-orientador Edison Zefa e Gustavo Shiedeck.

1.Biologia. 2.Minhocas. 3. Citologia. 4. Genética.I. Rocha, Marla Piumbini II. Zefa, Edison. III. Shiedeck, Gustavo. IV.Título.

CDD: 595.14

Vítor Falchi Timm

Análise citogenética e histológica de espécies de minhocas encontradas na região de Pelotas.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/11/2015

Banca examinadora:

.....

Profª. Drª. Marla Piumbini Rocha (Orientadora) Doutora em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas.

.....

Profª. Drª. Beatriz Helena Gomes Rocha Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes pela Universidade Federal de Pelotas.

.....

Profª. Drª. Rosângela Ferreira Rodrigues Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família por sempre me apoiar em minhas escolhas, pelos ensinamentos e pela educação a mim dados desde pequeno. Gostaria de agradecer a Profª. Drª. Marla Piumbini Rocha, por toda orientação, ajuda e ensinamentos. Também aos coorientadores Prof. Dr. Edison Zefa e Dr. Gustavo Shiedeck por toda ajuda e conhecimento que pude adquirir. Com certeza esses três excelentes profissionais são de suma importância para que eu me torne um profissional melhor. Um agradecimento especial aos membros da banca examinadora, Beatriz Rocha, Rosângela Rodrigues e Ana Paula Nunes, que colaboraram bastante com suas sugestões e conselhos para o melhoramento deste trabalho. Um agradecimento especial também aos técnicos do Laboratório de Histologia e Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, Eliane, Luís Augusto e Luís Otávio, que observaram de perto e ajudaram bastante na execução de alguns procedimentos do trabalho. Por fim, um obrigado à todos amigos e colegas que sempre estiveram do meu lado me apoiando, me dando força e me ajudando com conselhos e suas amizades.

Resumo

TIMM, Vítor Falchi. **Análise citogenética e histológica de espécies de minhocas encontradas na região de Pelotas.** 2015. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O Brasil é um país privilegiado quando se trata de diversidade de minhocas, sendo estas de grande importância ecológica por serem utilizadas em diversos minhocários que visam uma vermicompostagem de qualidade. O presente trabalho teve como objetivo fornecer subsídios citogenéticos e histológicos para a identificação de espécies de minhocas encontradas em minhocários na região de Pelotas. Foi realizada a coleta de 10 indivíduos nos seguintes minhocários: Estação Experimental Cascata da Embrapa Clima Temperado (Pelotas) e de propriedades rurais localizadas na colônia São Domingos (Morro Redondo), Assentamento da Palma (Capão do Leão) e colônia Sesmaria (São Lourenço do Sul). Também foram estudados indivíduos provenientes da Universidade Federal de Santa Maria, todas as coletas foram feitas no início do ano de 2015. Os indivíduos foram levados à Estação Experimental Cascata onde foram identificados previamente por características morfológicas externas e posteriormente analisados citogeneticamente e histologicamente. Para a análise citogenética, foi injetada colchicina 0,5% em vários pontos do corpo da minhoca com 24h de antecedência, posteriormente foram dissecadas, as vesículas seminais, escolhidas para a citogenética, foram colocados em solução hipotônica e, por fim, fixadas e coradas. Para a histologia, foram utilizados os primeiros segmentos, compreendidos desde a região do prostômio até o clitelo. Esse material foi submetido à técnica padrão de histologia, com inclusão em parafina e coloração por Hematoxilina e Eosina (HE). Dificuldades para obtenção de dados foram encontradas durante a realização do trabalho, entretanto, foi possível a montagem, caracterização citogenética e comparação do cariótipo da espécie encontrada. Dessa forma, foi possível confirmar o estreito relacionamento entre as espécies *E. andrei* e *E. fetida*, como também foi observado uma possível poliploidia em *E. andrei* que ainda não foi citada na literatura da espécie. Baseado nos dados histológicos, *E. andrei* e *E. fetida* apresentam um padrão semelhante em sua anatomia interna, embora a primeira apresente-se um pouco mais desenvolvida em relação ao trato digestório, sugerindo assim, que seja a espécie mais apropriada para utilização em minhocários que visam a produção de húmus. Durante a realização do experimento em 2015. houve problemas técnicos que impediram que o objetivo fosse alcançado, dessa forma, nem todos os objetivos puderam ser alcançados.

Palavras-chaves: Oligochaeta; minhocultura; poliploidia; *Eisenia*.

Abstract

TIMM, Vítor Falchi. **Cytogenetic and histological analysis of earthworm species found in Pelotas region.** 2015. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Brazil is a privileged country when it comes to diversity of earthworms, which are of great ecological importance for use in various minhocários aiming at vermicomposting quality. This study aimed to provide cytological and histological subsidies for identifying species of earthworms found in minhocários in Pelotas region. We collected 10 individuals in the following minhocários: Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado (Pelotas) and farms located in the São Domingos colony (Morro Redondo), Assentamento da Palma (Capão do Leão) and Sesmaria's colony (São Lourenço do Sul). Were also studied individuals from the Universidade Federal de Santa Maria, all collections were made at the beginning of 2015. The individuals were taken to the Estação Experimental Cascata which were previously identified by external morphology and later analyzed cytogenetically and histologically. For cytogenetic analysis, 0.5% colchicine was injected in various points of the body of the worm 24 hours in advance, were subsequently dissected, seminal vesicles, chosen for cytogenetics, were placed in hypotonic solution and, finally, fixed and stained . For histology, the first segments understood from the region of prostomium to the clitelo were used. This material was subjected to the standard technique of histology and embedded in paraffin and staining with hematoxylin and eosin (HE). Difficulties in obtaining data were found during the course of the work, however, the assembly was possible, cytogenetic characterization and comparison of the karyotype of species found. Thus, it was possible to confirm the close relationship between the species *E. andrei* and *E. fetida*, as was also observed a possible polyploidy in *E. andrei* that has not been mentioned in the literature of the species. Based on histological data, *E. andrei* and *E. fetida* show a similar pattern in their internal anatomy, although the first introduce yourself a bit more developed compared to the digestive tract, thus suggesting that it is the most suitable species for use in minhocários aimed at the production of humus. During the experiment in 2015 there were technical problems that prevented the goal was reached, therefore, not all the objectives could be achieved.

Key-words: Oligochaeta; earthworm breeding; polyploid; *Eisenia*.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema região corporal de minhoca (Ruppert et al. 2005).....	17
Figura 2	Fotografia de células de *Eisenia andrei* em divisão mitótica. Cromossomos evidentes (2n=22).....	18
Figura 3	Imagem do cariótipo de *Eisenia andrei* (2n=22).....	19
Figura 4	Imagem do cariótipo *Eisenia fetida* (2n=22) (Vitturi, 1991).....	19
Figura 5	Fotografia de células poliploides de *Eisenia andrei*.....	20
Figura 6	Fotografia de células de *Eisenia andrei* em meiose.....	20
Figura 7	Imagem de quatro núcleos de *Eisenia andrei* em meiose. Bivalentes e quiasmas (n=11).....	21
Figura 8	Fotografia da histologia geral de *Eisenia andrei*. Cutícula (Cut), epiderme (E), musculos circulares (MC), musculos longitudinais (ML), musculatura intestinal (MI), tiflossol (T), tecido cloragógeno (TC), intestino (Int), glândulas (G), abertura das cerdas (C) e cordão nervoso ventral (CN). (Obj. 4x).....	22
Figura 9	Fotografia da histologia geral de *Eisenia fetida*. Cutícula (Cut), epiderme (E), músculos circulares (MC), músculos longitudinais (ML), tiflossol (T), tecido cloragógeno (TC), intestino (Int), glândulas (G) e abertura das cerdas (C). (Obj 4x).....	23
Figura 10	Fotografia do padrão de cutícula (seta), epiderme com células glandulares (G), musculatura circular (MC) e longitudinal (ML) semelhante para *Eisenia andrei* (esquerda) e *Eisenia fetida* (direita) (Obj. 40x).....	24
Figura 11	Fotografia do intestino de *Eisenia andrei*. Tiflossol (seta), epitélio prismático (E) com microvilosidades (*), tecido muscular (M), tecido cloragógeno (C). (Obj. 40x).....	25

Sumário

1 Introdução..... 9

1.1 Objetivo..... 11

1.1.1 Objetivo geral..... 11

1.1.2 Objetivos específicos..... 11

2 Revisão de Literatura..... 12

2. 1 Citogenética..... 12

2. 2 Histologia..... 13

3 Materiais e Métodos..... 15

3. 1 Coleta dos espécimes..... 15

3. 2 Análise Citogenética..... 15

3. 3 Caracterização histológica..... 16

4 Resultados e Discussão..... 18

4. 1 Análise Citogenética..... 18

4. 2 Análise Histológica..... 22

5 Conclusão..... 26

Referências..... 27

1 Introdução

As minhocas surgiram no planeta há pelo menos 600 milhões de anos e de lá para cá tem co-evoluído com os sistemas naturais e humanos. Por suas habilidades no condicionamento físico, químico e biológico nos solos, as minhocas ganharam o status de "*ecosystem engineers*" por diversos autores (JOUQUET et al., 2006; LAVELLE et al., 2006).

Geralmente, as minhocas são estudadas em diversas áreas do conhecimento, como na transformação de resíduos orgânicos (GARG; KAUSHIK, 2005), no monitoramento de parâmetros ambientais (PULLEMAN et al., 2005), na avaliação de ecotoxicidade de produtos e substâncias (SIVAKUMAR; SUBBHURAAM, 2005; RÖMBKE et al., 2008), entre outras.

Em termos de diversidade de minhocas, o Brasil é privilegiado. De acordo com levantamentos recentes existem no país aproximadamente 305 espécies/subespécies de minhocas, podendo esse número chegar a mais de 1400. Desse total de minhocas conhecidas, 85% são nativas e 15% são exóticas (BROWN; JAMES, 2007).

Apesar de representarem um pequeno número de espécies, as minhocas exóticas assumem uma importância crucial nos ecossistemas. De acordo com Brown e James (2007) as espécies nativas parecem apresentar menor tolerância à perturbação ambiental, enquanto as exóticas se adaptam bem aos ambientes modificados pelo homem, podendo se tornar invasoras ou colonizadoras oportunistas, ocupando os espaços deixados vagos pelas nativas.

Por um lado, os agricultores reconhecem o papel benéfico das minhocas de uma forma geral no ambiente (SCHIEDECK et al., 2009), por outro, muitos trabalhos tem apontado efeitos negativos de minhocas exóticas, especialmente em agroecossistemas, que vão desde a compactação do solo (CHAUVEL et al., 1999) até perda de produtividade dos cultivos (BARTZ et al., 2009).

Os gêneros de minhocas exóticas de maior dispersão em território brasileiro são *Pontoscolex*, *Amynthas* (BROWN et al., 2006) e *Eisenia*, que é amplamente utilizado na minhocultura.

As espécies *Eisenia fetida* Savigny e *Eisenia andrei* Bouché apresentam ampla dispersão pelo mundo todo, embora não tenham grande importância em ecossistemas naturais. São as minhocas mais utilizadas na minhocultura para o manejo dos resíduos orgânicos e em estudos ecotoxicológicos, fisiológicos e genéticos, devido sua grande distribuição, ciclo de vida curto, fácil adaptação ambiental e criação em cativeiro (DOMÍNGUEZ, 2004). Contudo, sua similaridade morfológica externa é tão grande que muitas vezes se torna difícil distinguir qual espécie está sendo utilizada (DOMÍNGUEZ et al., 2005). A maioria dos trabalhos publicados no Brasil considera que a espécie utilizada na minhocultura é a espécie *E. fetida*.

Nesse sentido, os estudos citogenéticos e histológicos são ferramentas que podem auxiliar na taxonomia de minhocas. Na literatura não foram encontrados trabalhos sobre a citogenética e um descritivo-comparativo de histologia entre minhocas encontradas no Brasil. O presente trabalho fornecerá dados inéditos sobre a biologia de minhocas de importância na produção de húmus.

Os dados citogenéticos desse trabalho permitirão fazer um mapeamento das espécies de minhocas encontradas na região e assim, Em conjunto com a análise histológica, auxiliar os produtores para melhorar a produção de húmus em seus minhocários, indicando qual espécie é mais apropriada e fornecendo subsídios básicos sobre a sua biologia.

Grande parte dos trabalhos publicados no Brasil, que utilizam espécies de minhocas como indicadoras de qualidade de solo e para testes toxicológicos, dizem utilizar a espécie *E. fetida* em seus experimentos (Wang et al., 2015; GOBI; GUNASEKARAN, 2010). Com base em estudos preliminares na Embrapa Clima Temperado, a hipótese do presente trabalho é de que a espécie utilizada nestes trabalhos seja a *E. andrei*, havendo assim, um equívoco nas publicações.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo Geral

Fornecer subsídios citogenéticos e histológicos das espécies de minhocas utilizadas nos minhocários de Pelotas e região.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar em nível específico e mapear os indivíduos encontrados nos minhocários da região.
- Adaptar a técnica de citogenética para cada espécie de minhoca coletada.
- Descrever e analisar comparativamente a histologia e a citogenética das diferentes espécies de minhocas coletadas.

2 Revisão de Literatura

2. 1 Citogenética

Tanto as questões ambientais quanto as questões de identificação das espécies podem ser aprofundadas através da citogenética, pois essa ciência estuda a base física do sistema genético, os cromossomos, e alterações destes podem ser significativas para o rumo evolutivo das espécies (WHITE, 1973). Por isso, a citogenética é uma parte essencial para estudos sistemáticos de um grupo de organismos e pode ter um papel importante para gêneros taxonomicamente complicados (MUDAL, 1952).

A citogenética aplicada no estudo de minhocas é recente, não havendo muitos artigos publicados mundialmente. A primeira publicação de dados sobre o assunto foi realizada na metade do século XX na Inglaterra (MULDAL, 1952), sendo que em alguns trabalhos são informados apenas os números cromossômicos de algumas espécies e em outros, além do número apresenta também a morfologia, porém poucos com caracterização citogenética mais aprofundada.

Embora dados recentes afirmem que existam em torno de 300 espécies/subespécies de minhocas no Brasil, podendo esse número ser ainda mais elevado (BROWN; JAMES, 2007), não há artigos publicados sobre a citogenética de minhocas encontradas no Brasil, embora já existam pesquisadores estudando e desenvolvendo alguns trabalhos.

Um dos principais trabalhos relacionados à citogenética de Lumbricidae é o de Muldal (1952), que foi de grande importância para a definição de diversas espécies dessa família. Devido ao tamanho muito reduzido de alguns cromossomos, tornou-se difícil uma comparação exata entre os tamanhos, dessa forma, Muldal determinou cinco padrões de tamanhos para agrupar os cromossomos e, analisando também a quantidade de cromossomos de cada indivíduo, determinou as espécies. Em seu trabalho consta o número diploide de 29 espécies dentro de oito gêneros da família Lumbricidae.

Foi realizado por Vitturi (1991) uma análise citogenética da espécie *E. fetida*, no qual foram coletados 30 indivíduos da espécie e confirmado o número diploide 2n = 22, citado por Mudal (1952), evidenciando o cariótipo e o tamanho relativo de todos os cromossomos presentes nessa espécie.

Vitturi et al. (2000) realizaram o teste DNAr FISH em *Octodrilus complanatus* e *E. fetida* para verificar o grau de repetição telomérica (TTAGGG)n em seus genomas. Foi montado o cariótipo de *O. complanatus*, com número diploide de 2n = 36, onde sete pares eram metacêntricos/submetacêntricos e 11 acrocêntricos. A sequência telomérica (TTAGGG)n hibridizou com os terminais de todos os cromossomos de ambas as espécies. Regiões cistron, segmentos de DNA de informação de síntese de proteínas/peptídeos, foram encontradas em dois telômeros de cromossomos submetacêntricos em *E. fetida* e na região subterminal de dois cromossomos acrocêntricos em *O. complanatus*, deixando clara a relação entre o mapeamento do DNAr e a região organizadora de nucléolo (NOR).

Apesar dos poucos trabalhos relacionados à citogenética de minhocas, uma variedade de metodologias é utilizada para a obtenção de bons cromossomos em metáfase. Assim, no trabalho realizado por Timm et al. (2012), foi criada uma metodologia adaptada, baseando-se em diversas metodologias anteriormente utilizadas, para conseguir obter um maior número de metáfases com menos custo e tempo para desenvolvimento.

2. 2 Histologia

O estudo histológico de minhocas vem sendo cada vez mais realizado devido a grande quantidade de tóxicos que estão sendo usados nos solos, entretanto, estes estudos visam apenas as alterações causadas no interior das minhocas, não havendo artigos publicados que façam um comparativo em nível de espécies ou até mesmo de famílias, como também não foram encontrados artigos que corroborem se a histologia serve como diferenciador taxonômico nesse grupo ou não.

A espécie *E. fetida* foi utilizada para os estudos histológicos de Ruppert et al. (2005) e Bilej et al. (2010). Ruppert et al. (2005) utilizaram um corte transversal

ilustrativo como forma didática de visualização da anatomia interna, fazendo uma descrição dos órgãos que são encontrados. Segundo eles, a camada epidérmica apresenta células glandulares e é revestida por uma fina cutícula. Os músculos circulares e longitudinais são bastante desenvolvidos, devido ao tipo de locomoção, e os septos que dividem os celomas são relativamente completos. Já Bilej et al. (2010), mostraram um corte transversal real, descrevendo e indicando os tecidos e estruturas encontradas na região mediana do intestino.

Grande parte dos artigos que mencionam a histologia de minhocas não faz uma caracterização de como são estruturados os tecidos e órgãos em condições normais, apenas fazem uma análise de impacto de produtos e substâncias, como, por exemplo, herbicidas e metais pesados.

Morowati (2000) e Gobi e Gunasekaran (2010) fizeram análises no intestino de *Pheretima elongata* Parrier e *E. fetida*, após submeter essas espécies aos herbicidas glifosato e butaclor, respectivamente. Morowati (2000) percebeu que houve mudanças na estrutura histológica de *P. elongata*, observando a ruptura e morte de células do intestino, causando a morte de diversos indivíduos. Porém, após três semanas da exposição, foi relatada a renovação da camada epitelial do intestino e recuperação dos espécimes remanescentes. Gobi e Gunasekaran (2010) observaram grandes alterações nos tecidos de *E. fetida*. O herbicida utilizado destruiu a camada epitelial do intestino, reduziu o tecido cloragógeno, a biomassa, a quantidade de casulos e fundiu as vilosidades.

Wang et al. (2015) testaram o efeito de cinco neonicotinóides, pesticidas derivados da nicotina, em diferentes concentrações para análise dos impactos nas células da epiderme do intestino médio de *E. fetida*. Estes pesticidas tiveram ações semelhantes aos de Morowati (2000) e Gobi e Gunasekaran (2010). Foi constada uma crescente deterioração das células conforme aumentava a concentração dos pesticidas, algumas células da mucosa hipertrofiaram e foi observada uma irregularidade na compartimentação celular. Na maior concentração, foi observada a desintegração das células epidermais. O aumento na concentração de neonicotinóides no corpo da minhoca também ocasionou, além da degradação da compartimentação celular, uma diminuição da densidade do citoplasma e irregularidades na forma dos núcleos.

3 Materiais e Métodos

3. 1 Coleta dos espécimes

Foram coletados 10 indivíduos de quatro minhocários localizados na região de Pelotas durante o ano de 2015, embora o primeiro já estivesse sendo utilizado como local de estudo para trabalhos anteriores por nós mesmos. São eles: minhocário da Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado, localizado em Pelotas, RS (31°37'S, 52º31'O); minhocário de uma propriedade rural da Colônia São Domingos, no município de Morro Redondo, RS (31°32'S, 52°37'O), minhocário de uma propriedade rural do Assentamento da Palma, situada no município do Capão do Leão, RS (31°48'S, 52°28'O) e uma propriedade rural da Colônia Sesmaria, localizada em São Lourenço do Sul, RS (31°21'S, 52°16'O). Também foram utilizados indivíduos, ditos *E. fetida* e *E. andrei* já identificados, vindos do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, os quais também foram utilizados no experimento para a obtenção de resultados deste trabalho.

Os indivíduos coletados foram transportados em frascos plásticos de 2L, contendo o solo do local de coleta e tampa perfurada para aeração, até a Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado, onde foram identificados pelas características externas. Após a identificação, foram encaminhados à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas para serem submetidos às técnicas citogenéticas e histológicas.

3. 2 Análise citogenética

Para a análise citogenética, as minhocas foram colocadas em uma placa de pétri com parafina sólida, abertas utilizando bisturi com auxílio de pinças histológicas

e alfinetes para manter o corpo dos indivíduos aberto para a retirada da vesícula seminal. No trabalho de Timm et al. (2012), diversos órgãos das minhocas foram testados para verificar qual que apresentaria maior quantidade de divisões. Foi verificado que a vesícula seminal e os últimos segmentos, quando amputados 24h antes, apresentavam maiores números de divisões e, por questão de facilidade e economia de tempo, no presente trabalho foi utilizado a vesícula seminal.

Para a obtenção de cromossomos mitóticos em metáfase, foi realizada uma técnica adaptada por Timm et al. (2012), que consta na injeção de 0,5% de colchicina em várias regiões da minhoca 24h antes da dissecção (GARBAR; VLASENKO, 2007; SHEN et al., 2011), a retirada do órgão de estudo e posterior incubação em solução hipotônica de 3 a 5h e fixação com uma combinação de três fixadores com ordem crescente de concentração de ácido acético (fixador 1: 1mL de ácido acético/1,5mL de etanol/2mL de água destilada; fixador 2: 1mL de ácido acético/1,5mL de etanol; fixador 3: ácido acético 100%) ou em Carnoy (3 etanol:1 ácido acético). Para a coloração do material a ser analisado, foi realizada a técnica de esmagamento corada com orceína (HONGELL; TERHIVUO, 1989; VITTURI et al., 2000; KASHMENSKAYA; POLYAKOV, 2008; SHEN et al., 2011).

Para obtenção de cromossomos meióticos, o processo foi o mesmo, com exceção da aplicação de colchicina 24h antes da dissecção, para evitar o interrompimento da formação dos fusos mitóticos.

As lâminas foram analisadas utilizando a técnica de varredura de lâmina em microscópio óptico Nikon Eclipse E200, com uma câmera fotográfica Moticam 5, de cinco megapixels, acoplada. As melhores imagens de mitoses e meioses foram capturadas com a utilização do programa Motic® Imagem Plus 2.0.

3. 3 Caracterização histológica

Para a histologia, foi analisado um indivíduo por espécie de minhoca. Os cortes foram realizados nos primeiros 20 segmentos, que compreendem do prostômio até o clitelo e fixadas Bouin. As peças passaram pelo processo de desidratação, diafanização em xilol PA e inclusão em parafina.

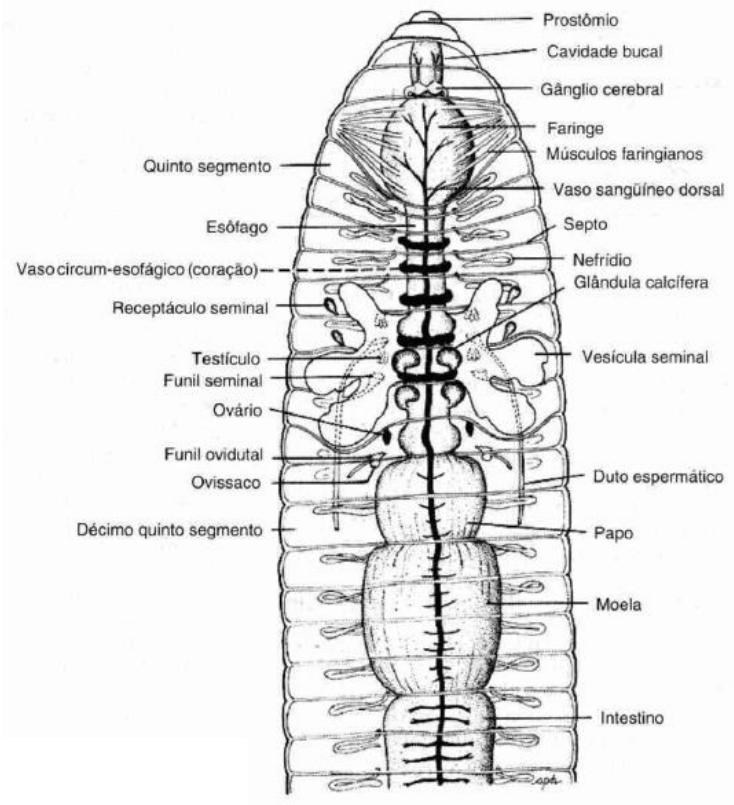

Figura 1 - Esquema região corporal de minhoca (Ruppert et al. 2005).

Logo após, foram realizados cortes seriados de 5µm e as lâminas numeradas e identificadas de acordo com a classificação taxonômica. Dos cortes seriados foram confeccionadas 15 lâminas histológicas para cada indivíduo, cada indivíduo com uma média de 50 cortes.

Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200, com uma câmera fotográfica Moticam 5, de cinco megapixels, acoplada. As imagens foram capturadas com a utilização do programa Motic® Imagem Plus 2.0.

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise Citogenética

Como resultado da metodologia utilizada para a obtenção de cromossomos, diversas células em divisão foram encontradas, tanto em mitose, quanto em meiose, e os cariótipos montados (Fig. 2).

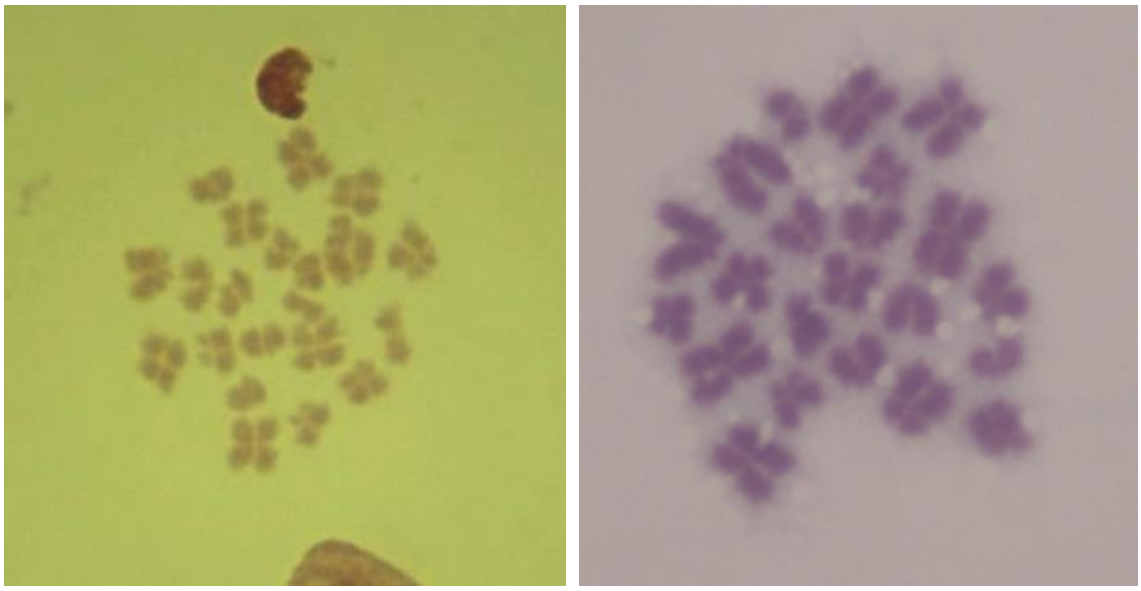

Figura 2 – Fotografia de células de *Eisenia andrei* em divisão mitótica. Cromossomos evidentes (2n=22).

Foi montado o cariótipo da espécie *E. andrei* (Fig. 3), com procedência do minhocário da Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado de Pelotas, que mostrou-se morfologicamente muito semelhante ao cariótipo proposto por Vitturi (1991) da espécie *E. fetida* (Fig. 4), espécie bastante confundida com a primeira devido a semelhanças morfológicas externas.

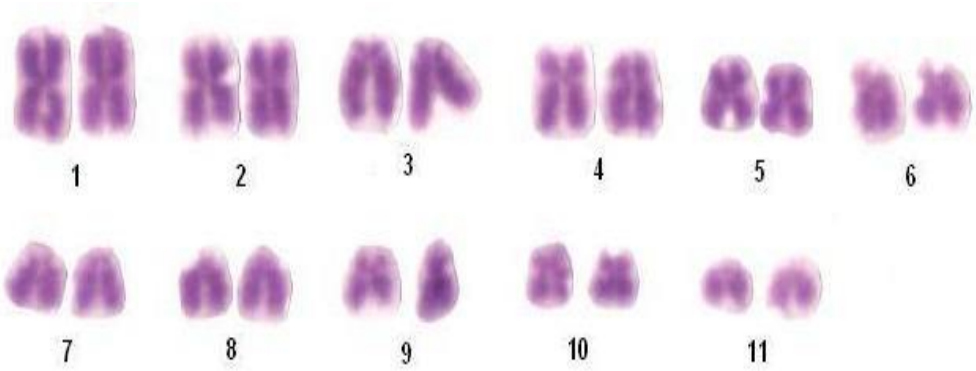

Figura 3 – Imagem do cariótipo de *Eisenia andrei* (2n=22).

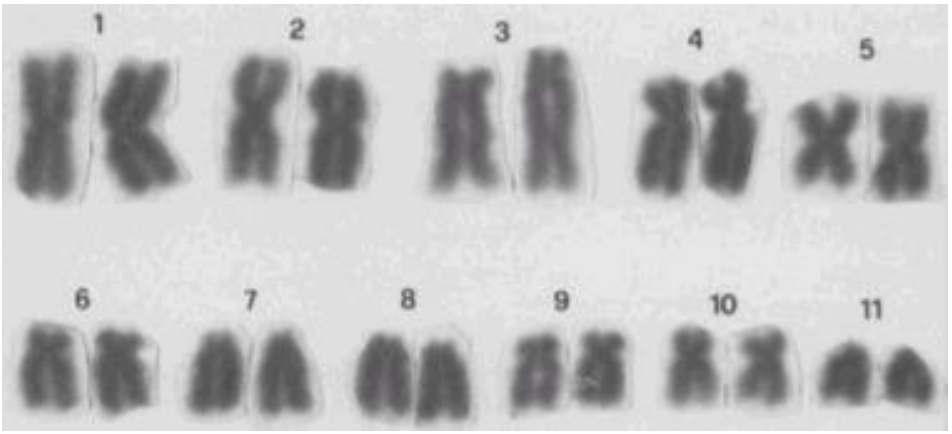

Figura 4 – Imagem do cariótipo de *Eisenia fetida* (2n=22) (Vitturi, 1991).

Ambos os cariótipos apresentaram-se com 2n = 22 cromossomos, sendo os pares 1, 2 e 5 metacêntricos, 4, 6, 9 e 10 submetacêntricos e 3, 7, 8 e 11 acrocêntricos.

Essa similaridade no número e na morfologia cromossômica confirma o estreito relacionamento entre essas duas espécies.

Além disso, também foram encontrados cromossomos agrupados de *E. andrei*, provavelmente de uma mesma célula, caracterizando assim, uma poliploidia (Fig. 5). Diversos autores, como Muldal (1952), Viktorov (1997), Garbar et al. (2009) e Shen et al. (2011), já relataram e confirmaram casos de poliploidia em Lumbricidae, todos estes relacionando a poliploidia à partenogênese. Partenogênese é uma estratégia reprodutiva que permite o desenvolvimento da poliploidia (SHEN et al., 2011).

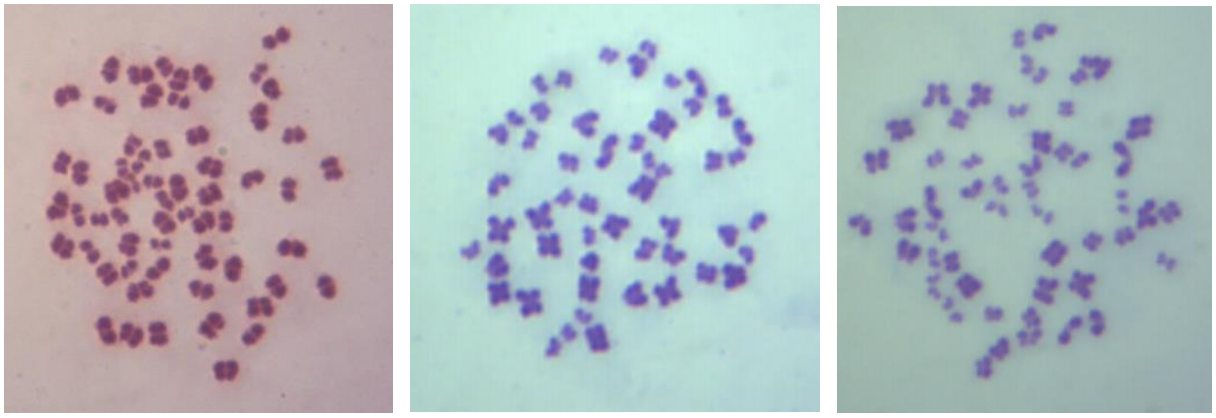

Figura 5 – Fotografia de células poliplóides de *Eisenia andrei*, com coloração de orceína (rosa) e Giemsa (azul/roxo).

Na meiose foi identificado um padrão de divisão nos cromossomos de *E. andrei*, onde constatou seu número haplóide n = 11 e cada bivalente apresentando um ou dois quiasmas terminais/subterminais durante o diplóteno/diacinese, garantindo ao bivalente uma forma ora de anel, ora de bastão. Foram constados também em alguns núcleos, bivalentes acrocêntricos com um único quiasma intersticial, o que conferiu ao par, a forma de cruz (Fig. 6 e Fig. 7).

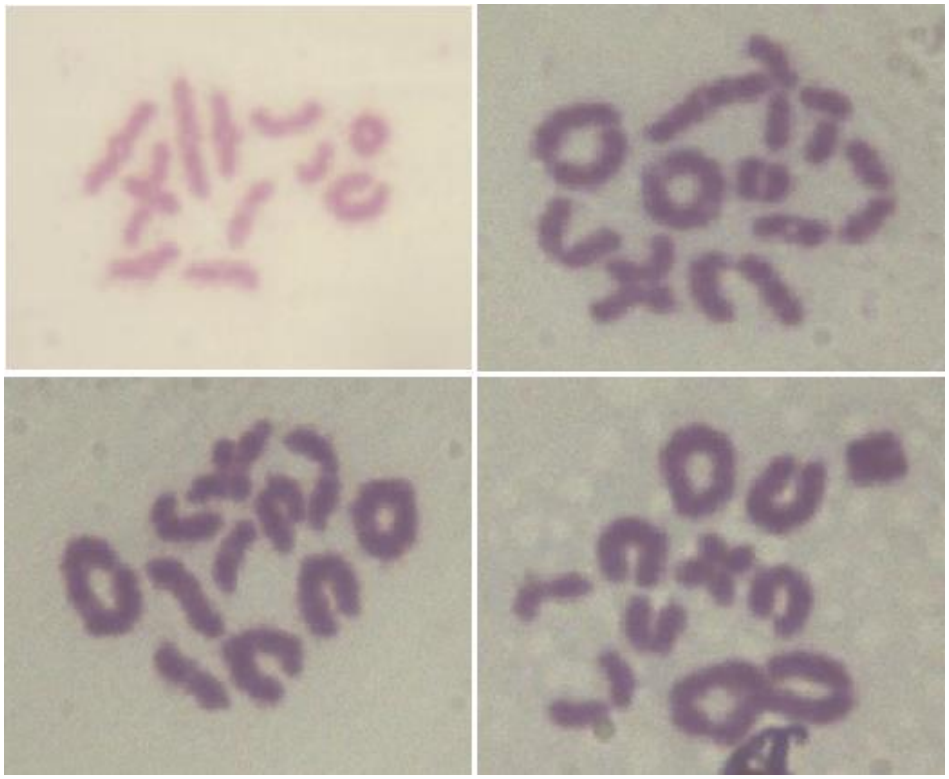

Figura 6 – Fotografia de células de *Eisenia andrei* em meiose (n=11).

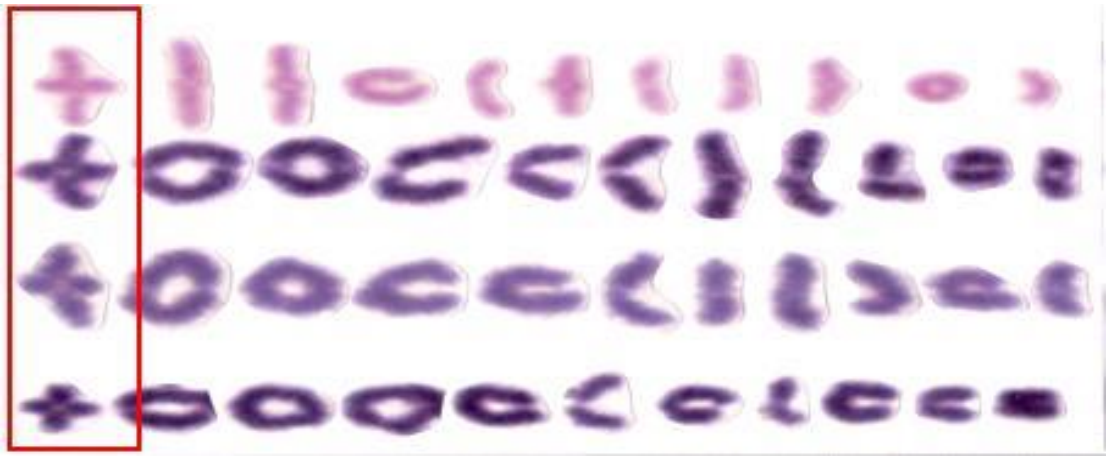

Figura 7 – Imagem de quatro núcleos de *Eisenia andrei* em meiose. Bivalentes e quiasmas.

Em 2015 não foi possível obter cromossomos de boa qualidade para as análises citogenéticas das espécies encontradas nos diferentes minhocários. Uma das hipóteses levantadas foi a questão da sazonalidade, contudo, embora o período de experimentação tenha durado cerca de dois anos, no ano de 2014 foram obtidos cromossomos das minhocas do minhocário da Embrapa em todos os meses do ano. Já no ano de 2015, quando as coletas foram realizadas nos demais minhocários, não foi possível obter divisões celulares.

Outra hipótese levantada foi o estresse da coleta e posterior encaminhamento para análise, onde a mudança de habitat faria com que ocorresse redução no número de células em divisão, pois as minhocas foram retiradas dos seus respectivos minhocários e acondicionadas em potes, com o mesmo substrato do minhocário, porém com um volume bastante reduzido em comparação ao anterior, por cerca de três a quatro dias até serem levadas ao laboratório para dissecção. Para descartar essa hipótese, toda a metodologia foi realizada na Embrapa Estação Experimental Cascata, onde a minhoca foi retirada do minhocário e logo submetida à dissecação. Também sem sucesso, porém as células apresentavam-se da mesma forma de quando as minhocas eram acondicionadas nos potes pequenos.

Assim, concluiu-se que a falta de células em divisão não está associado a fatores ambientais de clima e ao estresse de acondicionamento.

Devido a esse problema, não foi possível observar nem o número e nem a morfologia cromossômica tanto para *E. fetida*, quanto para *E. andrei* dos demais minhocários, impossibilitando o mapeamento das espécies na região.

4.2 Análise Histológica

Foram realizados estudos histológicos de dois indivíduos, sendo um indivíduo da espécie *E. andrei* proveniente da Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado, Pelotas e outro indivíduo da espécie *E. fetida*, proveniente da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Foram realizados cortes dos segmentos iniciais, região do prostômio até o clitelo, onde as peças foram emblocadas com o prostômio para cima. Os cortes na altura do prostômio foram descartados e os cortes seriados começaram na altura da cabeça (Fig. 8 e Fig. 9).

Figura 8 – Fotografia da histologia geral de *Eisenia andrei*. Cutícula (Cut), epiderme (E), musculos circulares (MC), musculos longitudinais (ML), musculatura intestinal (MI), tiflossol (T), tecido cloragógeno (TC), intestino (Int), glândulas (G), abertura das cerdas (C) e cordão nervoso ventral (CN). (Obj. 4x).

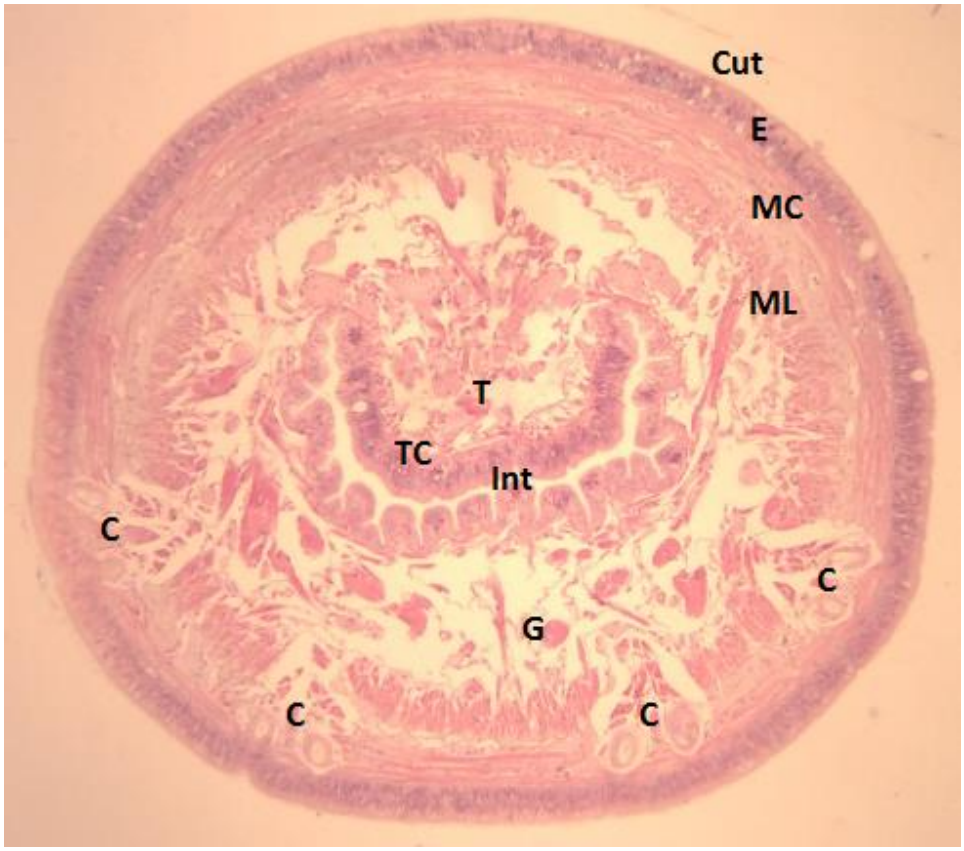

Figura 9 – Fotografia da histologia geral de *Eisenia fetida*. Cutícula (Cut), epiderme (E), músculos circulares (MC), músculos longitudinais (ML), tiflossol (T), tecido cloragógeno (TC), intestino (Int), glândulas (G) e abertura das cerdas (C). (Obj 4x).

Apesar dos cortes não serem exatamente dos mesmos segmentos, analisando os cortes sequencialmente é possível se observar um padrão geral na anatomia interna das espécies.

Os dados obtidos nesse trabalho corroboram com Ruppert et al. (2005), que observou uma fina cutícula sobrepõe uma epiderme repleta de células glandulares secretoras de muco. Os músculos, principalmente os circulares, são bastante desenvolvidos devido às contrações peristálticas, tipo de locomoção do grupo, onde a contração muscular circular causa um alongamento nos segmentos para o rastejamento e proporcionam um pulso de pressão no líquido celômico. Já os músculos longitudinais são mais importantes na escavação, dilatação e ancoragem dos segmentos no solo (RUPPERT et al., 2005). Embora os autores tenham se baseado na espécie *E. fetida* para fazer esta descrição, esse padrão histológico é notado também para *E. andrei* (Fig. 10).

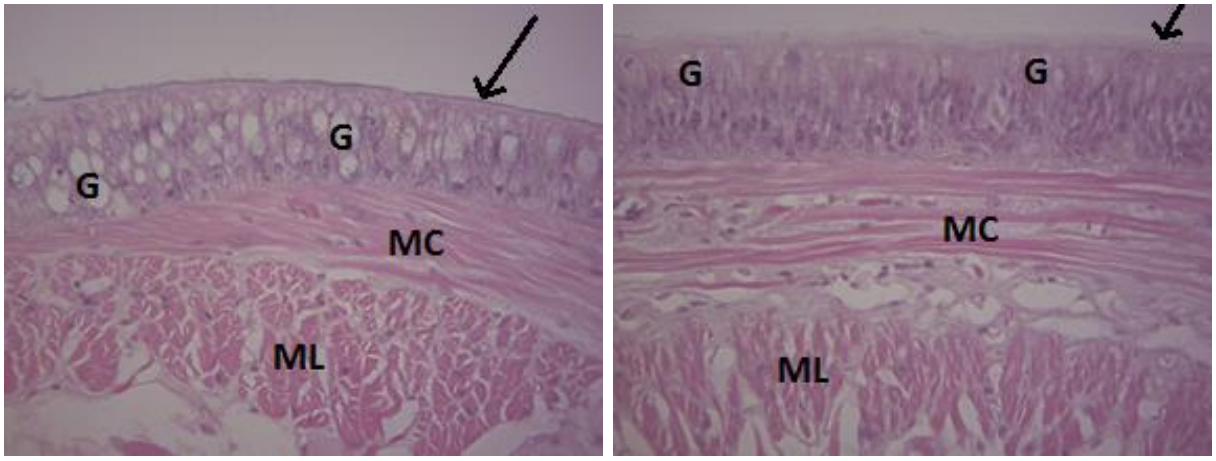

Figura 10 – Fotografia da histologia de *Eisenia andrei* (esquerda) e *Eisenia fetida* (direita). Padrão de cutícula (seta), epiderme com células glandulares (G), musculatura circular (MC) e longitudinal (ML) semelhantes (Obj. 40x).

O trato digestório é reto e relativamente simples. A cavidade bucal situa-se abaixo do prostômio e abre-se na faringe, que se apresenta revestida dorsalmente por musculatura e glândulas faringianas que secretam substâncias como muco e enzimas. Logo após a faringe, surge um túbulo esofágico estreito, onde chega ao papo, modificação da família Lumbricidae, que apresenta uma parede fina e tem função de armazenamento. Algumas glândulas, como as calcíferas, são encontradas em algumas partes do esôfago, porém sua funcionalidade ainda é incerta. O intestino segue como um tubo reto que se estende ao longo do corpo, com exceção de alguns últimos segmentos. A metade inicial do intestino tem função de secreção e digestão, enquanto a segunda metade tem função principalmente de absorção (RUPPERT et al., 2005).

O intestino é revestido por células prismáticas repletas de microvilosidades e logo no início é possível observar uma protuberância superficial bastante grande chamada tiflossol e ao redor de todo o intestino visualiza-se um aglomerado de células que formam o tecido cloragógeno (TC) (Fig. 11). De acordo com Ruppert et al. (2005), essas modificações tem função de aumentar a capacidade de absorção das minhocas, no caso do tiflossol, e síntese e armazenamento de glicogênio e gordura, no caso do tecido cloragógeno.

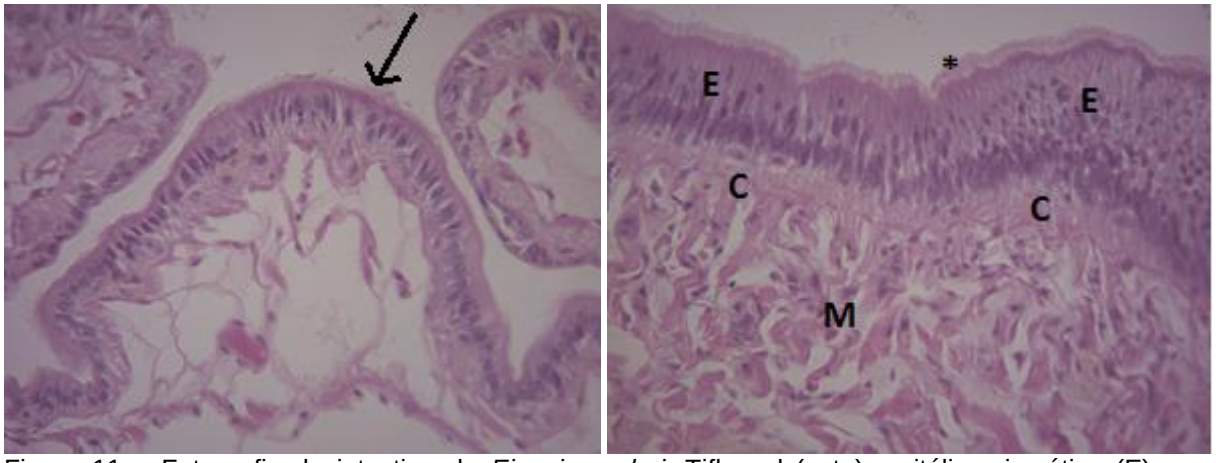

Figura 11 – Fotografia do intestino de *Eisenia andrei*. Tiflossol (seta), epitélio prismático (E) com microvilosidades (*), tecido muscular (M), tecido cloragógeno (C). (Obj. 40x).

Levando em conta que os cortes histológicos que estão sendo comparados são de segmentos bastante próximos, analisando o quadro comparativo em relação à digestão, síntese e armazenamento de substâncias, a espécie *E. andrei* apresenta-se mais desenvolvida que a *E. fetida*, mostrando ter um tiflossol mais proeminente, tendo assim, uma área de absorção intestinal maior, e tecido cloragógeno com uma quantidade maior de células e musculatura.

Domínguez (2004) cita *E. fetida* e *E. andrei* como as principais espécies utilizadas nas minhoculturas para diversas finalidades. Em questão de qualidade de húmus, um sistema digestório mais desenvolvido pode fazer a diferença no produto final, aumentando a qualidade do adubo e, consequentemente, a qualidade do solo. Dessa forma, baseado no estudo histológico, a espécie *E. andrei* pode ser a mais apropriada para a utilização em minhocários que visam essa produção. Entretanto, esses dados precisam ser comprovados com pesquisas comparativas na produção de húmus.

Em corte histológico, é possível observar uma fusão de dois cordões nervosos ventrais (Fig. 11). De acordo com Ruppert et al. (2005), existem cinco fibras nervosas gigantes dentro de cada cordão, três são muito grandes e se agrupam no lado meio-dorsal, as outras duas, menos evidentes, situam-se no meio-ventral e apresentam-se mais largamente separadas.

5. Conclusões

Apesar das dificuldades encontradas durante a realização do trabalho, o que dificultou a obtenção de alguns dados, foi confirmado que, tanto a *E. andrei*, quanto a *E. fetida* apresentam o número diploide considerado menos derivado dentro da família Lumbricidae (2n=22). Além disso, ficou evidente o relacionamento entre as duas espécies, pois ambas apresentam o mesmo número e morfologia cromossômica, assim, concluindo também, que as características citogenéticas em nível de coloração convencional não servem como carácter taxonômico.

O surgimento de células poliploides em *E. andrei*, que já é comum em algumas espécies do mesmo gênero, sugere que esta espécie esteja realizando partenogênese em certas ocasiões, embora a reprodução sexuada ainda seja a principal estratégia reprodutiva.

Em comparação histológica, sugere-se que a espécie *E. andrei* seja a mais apropriada para a utilização em minhocários que visam a produção de húmus de melhor qualidade por apresentar um sistema digestório aparentemente mais desenvolvido que *E. fetida*, embora ambas tenham se mostrado satisfatórias quando utilizadas em testes ecotoxicológicos.

Referências

BARTZ, M.L.C.; BROWN, G.G.; PASIN, A.; LIMA, A.C.R. de; GASSEN, D.N. As minhocas e o manejo do solo: o caso do plantio direto do arroz irrigado. **Revista Plantio Direto**, jul/ago. p. 4-8, 2009.

BILEJ, M.; PROCHÁZKOVÁ, P.; SILEROVÁ, M.; JOSKOVÁ, R. Earthworm Immunity. In: Invertebrate Immunity. **Springer**. v. 708. p. 316, 2010.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W.; PASINI, A.; NUNES, D. H.; BENITO, N. P.; MARTINS, P. T.; SAUTTER, K. D. Exotic, peregrine and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, v. 42, p. 111-117, 2006.

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, 508 p., 2007.

CHAUVEL, A.; GRIMALDI, M.; BARROS, E.; BLANCHART, E.; SARRAZIN, M.; LAVELLE, P. Pasture degradation by an Amazonian earthworm. **Nature**, London, v. 389, p. 32-33,1999.

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.

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

GARBAR, 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.

GARG, V.K.; KAUSHIK, P. Vermistabilization of textile mill sludge spiked with poultry droppings by an epigeic earthworm Eisenia foetida. **Bioresource Technology** 96: 1063–1071, 2005.

GOBI, M.; GUNASEKARAN, P. Effect of Butachlor Herbicide on Earthworm Eisenia fétida-Its Histological Perspicuity. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2010. p. 1-4, 2010.

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.

JAENIKE, J.; SELANDER, R.K. Evolution and ecology of parthenogenesis in earthworms. **American Zoologist**. v. 19, p. 729–737, 1979.

JOUQUET, P.; DAUBER, J.; LAGERLO, J; LAVELLE, P.; LEPAGE, M. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and acidental effects on soil and feedback loops. **Applied Soil Ecology** 32: 153–164, 2006.

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.

LAVELLE, P.; DECAËNS, T.; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P.; ROSSI, J.-P. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology** 42: S3–S15, 2006.

MOROWATI , Mohssen. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. **The Environmentalist**. v.20, p. 105-111, 2000.

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

PULLEMAN, M.M.; SIX, J.; UYL, A.; MARINISSEN, J.C.Y.; JONGMANS, A.G. Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. **Applied Soil Ecology** 29 (1), 1–15, 2005.

RÖMBKE, J.; WAICHMAN, A.V; GARCIA, M.V.B. Risk assessment of pesticides for soils of the Central Amazon, Brazil: comparing outcomes with temperate and tropical data. **Integr Environ Assess Manag.** 4(1): 94-104, 2008.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2005.

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

SCHIEDECK, G ; SCHIAVON, G. de A. ; MAYER, F.A. ; LIMA, A.C.R. Percepção de agricultores sobre o papel das minhocas nos agroecossistemas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 856-859, 2009.

SIVAKUMAR, S.; SUBBHURAAM, C.V. Toxicity of chromium(III) and chromium(VI) to the earthworm Eisenia fetida. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 62: 93–98, 2005.

TIMM, V. F.; ROCHA, M. P.; SHIEDECK, G.; ZEFA, E. Adaptação metodológica de citogenética para minhocas. In: XXI Congresso de Iniciação Científica, 4º Mostra Científica, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

VIKTOROV, A.G. Diversity of polyploid raves in the family Lumbricidae. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, n. 3/4, p. 217-221, 1997.

VITTURI, R. Karyotype analysis, nucleolus organizer regions and C-banding pattern of Eisenia foetida (Oligochaeta, Lumbricidae). **Genetica**, p. 159-165, 1991.

WANG, C.; CUI, F.; LI, D.; QI, S.; MU, X.; PANG, S.; WANG, K. Biological response of earthworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides. **Chemosphere**. v. 132, p. 120-126, 2015.

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