

137 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE OLIGOQUETAS

Ricardo Bemfica Steffen; Tatiana Benedetti; Zaida Inês Antonioli¹.

RESUMO

Estudos da diversidade de oligoquetas em diferentes áreas agrícolas tem sido importantes, pois esses organismos apresentarem benefícios importantes quando usados como indicadores da qualidade do solo. A identificação destes organismos, ainda é basicamente pelas características morfológica, entretanto, o uso de técnicas moleculares poderá facilitar o processo de identificação. Assim buscou-se se desenvolver um protocolo para extração de DNA desses organismos, para possibilitar o estudo de sua diversidade genética.

PALAVRAS-CHAVE: Oligoquetas, DNA, diversidade.

INTRODUÇÃO

Os Egípcios foram os primeiros a reconhecer a importância das minhocas, atribuindo a fertilidade das margens do rio Nilo a atividade destes organismos. A importância das minhocas para o solo foi ressaltada por Gilbert White, o qual, resumiu suas observações em uma frase que designou as minhocas como "The intestines of the earth". Até quase o final do século XX as minhocas eram vistas como pragas agrícolas, que deviam ser combatidas. Deve-se aos trabalhos de Darwin o reconhecimento do real papel das minhocas na natureza. Com o livro "The origin of the species", Darwin demonstrou que a ecologia animal tem uma direção com dois sentidos, os animais sofrem a influência do meio mas, também influem sobre o meio. Embora os escritos de Darwin tenham mais de um século, há poucos anos atrás, os pesquisadores estudavam apenas um dos sentidos, a dependência dos organismos em relação ao ambiente. Só com o recente desenvolvimento da pedobiologia, aumentaram os estudos, especialmente no que se refere aos grupos animais do solo, alguns dos quais funcionando como bioindicadores de condições do solo (Giller *et al.* 1998).

A minhocultura constitui-se em uma excelente alternativa para redução de impactos ambientais, desempenhando um grande papel na bioacumulação de metais pesados, auxiliando na redução do volume de lixo, ao mesmo tempo em que, o disponibiliza como fertilizante e fonte energética. O uso da minhocultura tem-se concretizado como uma

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria/RS. CEP 97119-900. e-mail: bsteffen@terra.com.br

importante forma de tratamento de poluentes, reduzindo desta forma, os problemas de saúde pública. As minhocas apresentam também um elevado teor protéico, caracterizando um grande potencial na geração de alimentos. Além disso, contribui nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo a ponto de ser um excelente mecanismo na recuperação de solos degradados.

Vários estudos tem demonstrado a existência de níveis significativos da variação gênica intra e interpopulacional em uma mesma espécie de oligoquetas (Cavalli-Molina, 1984). Toda a diversidade dos seres vivos baseia-se em última instância na diversidade genética que está codificada nos genes, segmentos de moléculas de DNA. Na área de microrganismos de solos existem trabalhos estudando a biodiversidade de microrganismos do solo baseado em caracterização genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Entretanto, com alguns grupos de animais existem poucos trabalhos, entre os quais as oligoquetas, onde a caracterização ainda é feita por caracteres morfológicos, sendo uma análise bastante demorada e que requer um conhecimento profundo de taxonomia destes organismos.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, a caracterização destes organismos é mais rápida e precisa. Com este objetivo desenvolveu-se uma metodologia para extração do DNA das minhocas, o que facilitará o trabalho de pesquisadores que buscam identificar e diferenciar as espécies de oligoquetas presente no ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Minhocas de duas espécies foram coletadas no experimento sobre o efeito do modo e doses de aplicação de calcário em sistema de plantio direto, na área experimental do Departamento de Solos da UFSM.

As amostras de solos de 25x25x25 cm foram coletadas nas parcelas, armazenadas em sacos de polietileno e mantidas em caixas de isopor até o transporte ao laboratório. As minhocas foram extraídas das amostras de solo e lavadas em água corrente. Após caracterização visual de grupos idênticos, 10 indivíduos de cada espécie de *Eisenia fetida* e *Pheretima* sp. foram colocados em álcool a 70% para posterior caracterização segundo padrões morfológicos de espécies. Outros 10 indivíduos foram abertos e retirou-se todo o material existente no seu interior, para serem submetidos à maceração e posterior extração do DNA.

Após vários testes e repetições de diferentes procedimentos e reagentes, o protocolo que foi eficiente na extração de DNA de oligoquetas foi o descrito abaixo:

Macerou-se 10 g de material previamente limpo com nitrogênio líquido; adicionou-se o buffer de extração CTAB (2%) até o material apresentar consistência líquida; colocou-se 600µl do material em um tubo Eppendorf esterilizado; incubou-se o material a 65°C por 20 min; adicionar 400µl de clorofórmio:álcool isoamyl (24:1), misturou-se em misturador à 62 rpm por 15 minutos; centrifugou-se a 13000 rpm por 8 min; Transferiu-se a parte aquosa para um tubo eppendorf estéril; adicionar 400µl de Isopropanol, misturou-se e deixou-se a temperatura ambiente por 5 min; centrifugou-se a 13000 rpm por 8 min; descartou-se o sobrenadante, e inverteu-se o tubo para secar o pellet; adicionar 100µl de etanol 100% gelado, misturando com cuidado e deixar a temperatura ambiente por 5 min; centrifugou-se a 13000 rpm por 8 min. Descartou-se o etanol e ressuspender o pellet com 100µl de água MILIQ gelada. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C.

O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose 1,2%. Após será aplicada primers para a caracterização de polimorfismo entre as espécies. Todo o procedimento seguiu as recomendações de Sambrook *et al.* (1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se com sucesso a extração do DNA genômico das espécies de oligoquetas (Figura 1).

A partir da obtenção do DNA genômico, serão realizadas análises com o objetivo de observar a presença de variabilidade interespecífica com a utilização de primers GATA e GACA os quais provavelmente demonstram a variabilidade genética destas espécies.

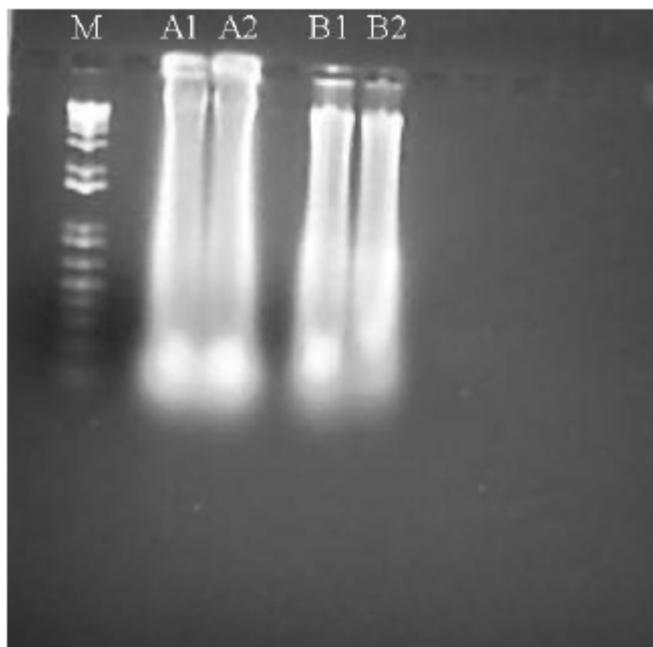


FIGURA 1: DNA genômico de *Eisenia fetida* (A1, A2) e *Pheretima* sp. (B1, B2), Marcador molecular Gibco 1 Kb (M).

LITERATURA CITADA

GILLER, K.E., BEARE M. H., LAVELLE, P., IZAC P. N., & SWIFT M.J. , Earthworms as bioindicators of cultivated soils? Ecological Bulletins - Swedish Natural Science Research Council. Volume 39, pages 45-47. 1998.

CAVALLI-MOLINA, S. Variabilidade genética em populações naturais de *Reibunium hypocarpium*. Porto Alegre: UFRGS, 231p. 1984. Tese Doutorado.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 200p. 1998. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).

SANBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. 1987.