

## ANÁLISE FILOGENÉTICA DO MINHOCUÇU *RHINODRILUS ALATUS*, RIGHI 1971 (GLOSSOSCOLECIDAE: ANNELIDA) BASEADA EM SEQUÊNCIAS DOS GENES DE rDNA 5.8S, DO ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS1) E DA SUBUNIDADE I DA CITOCROMO C OXIDASE MITOCONDRIAL

Flávia de Faria SIQUEIRA, Sávio Henrique de Cicco SANDES, Sílvia Helena Costa CAMPOS, Cleusa Graça da FONSECA, Rogério Parentoni MARTINS, Maria Auxiliadora DRUMOND & Maria Raquel Santos CARVALHO

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, nº 6627, Pampulha, CEP 31.270-901 – Belo Horizonte, MG, Brazil, e-mail: mraquel@icb.ufmg.br

Siqueira, F. de F., S. H. de C. Sandes, S. H. C. Campos, C. G da Fonseca, R. P. Martins, M. A. Drumond & M. R. S. Carvalho. 2010. Análise filogenética do minhocoçu *Rhinodrilus alatus*, Righi 1971 (glossoscolecidae: annelida) baseada em sequências dos genes de rDNA 5.8S, do espaço interno transcrito (its1) e da subunidade i da citocromo C oxidase mitocondrial. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, Número Especial 2: 59-77.

**RESUMO.** O minhocoçu *Rhinodrilus alatus* Righi, 1971 é uma espécie endêmica do cerrado de Minas Gerais e tem sido explorada como isca para pesca por >70 anos. O objetivo do trabalho foi validar marcadores moleculares para estudos genético-populacionais, de filogenia e de filogeografia do minhocoçu. Os genes rRNA 5.8S, espaço interno transcrito (ITS1) e subunidade I da citocromo oxidase (COI) mitocondrial foram estudados. Foram amostrados indivíduos da espécie *R. alatus* (n = 53) em diferentes habitats de Minas Gerais e da espécie *R. motucu* Righi, 1971 (n = 3), coletados em brejos de Goiás, no Brasil. A análise filogenética do gene do rRNA 5.8S mostrou que todas as sequências de *R. alatus*, *R. motucu* e *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) agruparam-se no mesmo clado (*bootstrap* = 98), sugerindo que, nestes organismos, o gene é conservado. Os cladogramas formados a partir de sequências de rRNA 5.8S de invertebrados disponíveis na base de dados são inconsistentes do ponto de vista evolutivo, sugerindo taxas evolutivas distintas entre diferentes espécies. Para a região do ITS1, foram obtidos 11 sítios polimórficos, gerando nove haplótipos. Os exemplares de *R. motucu* apresentaram o haplótipo mais freqüente dentre os *R. alatus* de Minas Gerais, não havendo evidências moleculares de que se tratem de espécies diferentes. Para o gene COI, de um total de 634 pb, obteve-se 185 sítios polimórficos, gerando árvores filogenéticas com topologia mais adequada, separando *R. motucu* de *R. alatus*.

**Palavras chave:** Filogenia molecular, *Rhinodrilus alatus*, conservação genética.

Siqueira, F. de F., S. H. de C. Sandes, S. H. C. Campos, C. G da Fonseca, R. P. Martins, M. A. Drumond & M. R. S. Carvalho. 2010. Análisis filogenético del minhocoçu *Rhinodrilus alatus*, Righi 1971 (glossoscolecidae: annelida), basada en secuencias de los genes de rDNA 5.8S, del

espacio interno transcrito (its1) y de la subunidad I de la citocromo C oxidasa mitocondrial. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, Número Especial 2: 59-77.

**RESUMEN.** La lombriz de tierra gigante (minhocoçu) *Rhinodrilus alatus* Righi, 1971 es una especie endémica del cerrado del estado de Minas Gerais y ha sido explorada como sebo para la pesca por más de 70 años. El objetivo de este trabajo fue el de validar los marcadores moleculares para estudios genético-poblacionales, de filogenia y filogeografía de este minhocoçu. Los genes rRNA 5.8S, el espaciador interno transcrito (ITS1) y la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) mitocondrial fueron estudiados. Se colectaron individuos de *R. alatus* (n = 53) en diferentes hábitats del estado Minas Gerais e individuos de *R. motucu* Righi, 1971 (n = 3) en pantanos del estado de Goiás, Brasil. El análisis filogenético del gen rRNA 5.8S mostró que todas las secuencias de *R. alatus*, *R. motucu* y *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) se unieron en el mismo clado (*bootstrap* = 98), sugiriendo que, en estos organismos, el gen es conservado. Los clados formados a partir de las secuencias de rRNA 5.8S de invertebrados disponibles en la base de datos son inconsistentes de punto de vista evolutivo, sugiriendo tasas de evolución distintas entre diferentes especies. Para la región del ITS1, se obtuvieron 11 sitios polimórficos, generando nueve haplotipos. Los ejemplares de *R. motucu* presentaron el haplotipo más frecuente entre los *R. alatus* de Minas Gerais, no habiendo evidencias moleculares de que sean especies diferentes. Para el gen COI, de un total de 634 pb, se obtuvieron 185 sitios polimórficos, generando árboles filogenéticos con topología más adecuada, separando *R. motucu* de *R. alatus*.

**Palabras clave:** Filogenia molecular, *Rhinodrilus alatus*, conservación genética.

## INTRODUÇÃO

O filo Annelida possui cerca de doze mil espécies descritas, com ampla distribuição nos nichos ecológicos, ocupando ambientes marinhos, de água doce e terrestres (Ruppert *et al.* 2005). Tradicionalmente, o filo é dividido em dois grandes grupos: os Clitellata, que compreendem minhocas (Oligochaeta) e sanguessugas (Hirundinea), e os Polychaeta, representados por vermes marinhos.

As minhocas são membros importantes da comunidade do solo, devido à sua habilidade de alterar seu habitat e criar novos nichos para outros organismos através de suas atividades. Estes organismos penetram no solo aumentando sua macroporosidade, contribuem para a transformação da matéria orgânica e a mineralização de nutrientes para as plantas. Além de mudar a diversidade e atividade microbiana no solo, as minhocas também produzem fezes ricas em nutrientes (Römbke *et al.* 2005).

O minhocoçu *Rhinodrilus alatus* Righi, 1971, da família Glossoscolecidae, é uma espécie endêmica dos cerrados da região central de Minas Gerais, Brasil, e, devido à destruição do seu habitat e à intensa atividade extrativista foi incluído na lista das espécies ameaçadas do Estado e do Brasil (Machado *et al.* 2005), sob a categoria 'em perigo de extinção' (Righi 1998). O minhocoçu é extraído para uso como isca de pesca há cerca de 70 anos na região de Paraopeba (Drumond *et al.* 2008). Além da captura indiscriminada, sua pouca capacidade de dispersão e as práticas agrícolas também contribuem para a escassez do animal. Ainda não foi possível sua criação em cativeiro e, além disso, estes organismos não são facilmente encontrados como outras iscas (lambaris, tuviras e minhocas comuns) (Campos 2007).

O extrativismo é considerado sócio-ambientalmente impactante sob diversos aspectos, nos quais se incluem o uso excessivo das populações de minhocuçus, o impacto do processo de extração sobre o solo e sobre várias espécies de plantas do cerrado, as pressões constantes sobre a Floresta Nacional de Paraopeba e os frequentes conflitos entre extratores e proprietários de terras (Drumond *et al.* 2008). Assim, são necessárias ações de manejo e conservação da espécie, uma vez que o minhocuçú é um recurso natural ameaçado, de grande importância para a sobrevivência de milhares de pessoas, cujas populações remanescentes constituem um reservatório de material genético a ser preservado.

A filogenética molecular é uma das mais ativas áreas de pesquisa em biologia evolutiva e tem grande ligação à genética da conservação. Esta é uma ciência aplicada, que tem, entre outros, o importante objetivo de descrever a composição genética e genômica de pequenas populações ameaçadas. Usados como indicadores da história natural de uma população e de seu futuro, a genética de populações, a filogenética e a filogeografia fornecem informações fundamentais ao desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação de espécies ameaçadas (O'Brien 1994).

Os rápidos avanços da biologia molecular têm resultado na geração de um grande número de sequências de DNA depositadas em bancos de dados públicos. Isso permite a realização de estudos comparativos de genomas ou sequências gênicas, podendo-se, assim, inferir dados evolutivos. A maioria dos estudos moleculares desenvolvidos em Annelida é de filogenia e se baseia no sequenciamento de genes como 5.8S, 18S, 28S, 12S, 16S rRNA (Beauchamp *et al.* 2001, Jamieson *et al.* 2002), subunidade I da citocromo oxidase (COI; Pop *et al.* 2003), citocromo B (Cyt B; Bleidorn *et al.* 2006), genes do desenvolvimento (Hox e ParaHox; Cho *et al.* 2004, Fröblius & Seaver 2006) e fator de alongamento 1 $\alpha$  (Kojima 1998).

Nenhum estudo com marcadores moleculares de DNA foi desenvolvido até o momento em *R. alatus* e não há sequências desta espécie disponíveis em bancos de dados públicos. A espécie de Oligochaeta mais próxima, para a qual sequências estão sendo geradas, é a minhoca de climas temperados *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, 1843 com mais de 20.000 sequências produzidas (NCBI 2008). Desse modo, não se sabe ao certo se quantas espécies existem, quais as suas relações filogenéticas, como são estruturadas suas populações ou o quanto a diversidade genética já foi impactada pela extração intensiva.

Para a realização deste estudo com *R. alatus*, utilizou-se a região codificadora do gene rRNA 5.8S, o espaço interno transcrito 1 (ITS1) e a subunidade I da citocromo oxidase mitocondrial (COI). O complexo gênico de RNA ribossomal (rRNA) nuclear é uma unidade de repetições em tandem, com uma a muitas centenas de cópias (Fig. 1). Este complexo possui muitos domínios, que evoluem a taxas variadas, possuindo, assim, diferentes utilidades filogenéticas (Jorgenson & Cluster 1988). Por outro lado, devido a seu grande conteúdo de informações, genomas mitocondriais têm sido úteis em análises filogenéticas (Bleidorn *et al.* 2006).



**Figura 1.** Esquema do complexo gênico nuclear de DNA ribossomal, que contém os genes das subunidades do rDNA 18S, 28S e 5.8S, além dos espaços internos transcritos (ITS1 e ITS2). As setas indicam a posição dos iniciadores (*primers*) usados nas reações de PCR e a região amplificada.

Este trabalho tem como objetivo validar marcadores moleculares, como o gene 5.8S de rRNA, o ITS1 e o mtDNA COI, que permitam, através de análises filogenéticas, acompanhar ao longo do tempo o impacto da atividade extrativista e servir de ferramenta para monitoração da diversidade genética no âmbito de um projeto de manejo e uso sustentado do minhocoçu.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta dos indivíduos

Indivíduos da espécie *R. alatus* (N = 53) foram coletados em diferentes municípios e habitats (Tabela I) da região de Paraopeba, com o auxílio de extratores. No campo, foi feita a morfometria de cada indivíduo e os mesmos foram colocados em álcool 100%. No laboratório, após a dissecação e retirada dos pedaços de músculo para análise genética, os espécimes foram fixados em formol 10%. Amostras de *R. motucu* Righi, 1971 (N = 3), coletados em brejos de Goiás, foram também utilizados nesse estudo.

### Extração do DNA e amplificação de fragmentos por Reação da Cadeia de Polimerase

Fragmentos de músculo foram dissecados e mantidos em etanol 70% a 4°C até o momento da extração do DNA. A extração de DNA foi feita seguindo-se o protocolo de precipitação salina descrito por Miller *et al.* (1988), adaptado conforme a seguinte descrição: fragmentos de tecido muscular medindo 0,4 × 0,4 cm foram transferidos para tubos tipo Eppendorf, de 1,5 µL, ao quais se acrescentou 500µL de SE (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH8,0) e 25µL de duodecilsulfato de sódio a 20%, e 20µL de proteinase K a 20mg/mL. Após incubar *overnight* à 56°C, adicionou-se um décimo do volume total de NaCl 5M e centrifugou-se durante 10 minutos a uma velocidade de 13000rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde se adicionou o dobro do volume de etanol 100% gelado. Os tubos foram colocados durante 20 minutos em freezer a -20°C, centrifugados durante 15 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Lavou-se o pellet duas vezes com etanol 70%

**Tabela I.** Indivíduos estudados, segundo município e hábitat, para cada marcador analisado.

Município	Habitat	5.8S/ITS	COI
Cordisburgo	Brejo	5	2
Morro da Garça	Cerradão	1	—
Curvelo	Campo Sujo	1	1
Papagaio	Cerrado	3	1
Paraopeba	Braquiária	1	—
Baldim	Cerradão	1	—
Cordisburgo	Lagoa Drenada	3	1
Pontinha	Cerrado	1	—
Paraopeba	Cerrado	3	—
Paraopeba	Cerradão	3	—
Paraopeba	Eucaliptal	2	—
Cordisburgo	Cerradão	6	5
Pontinha	Eucaliptal	2	—
Cordisburgo	Campo Cerrado	2	—
Pompéu	Cerrado	3	1
Curvelo	Cerradão	2	—
Corinto	Veredas	2	—
Corinto	Cerrado	2	1
Andrequicé	Cerradão	2	—
Três Marias	Cerrado	—	1
Lassance	Cerrado	—	1
Sete Lagoas	Cerrado	—	1
Maravilhas	Cerradão	—	2
Total		45	17

gelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Uma vez desprezado o álcool 70%, os tubos permaneceram à temperatura ambiente no intuito de deixar evaporar o etanol restante por 15 minutos, à temperatura ambiente, e o DNA foi ressuspendido com 300 $\mu\text{L}$  de TE (10mM TRIS; 1 mM EDTA, pH7,4).

A região do gene que codifica o rRNA 5.8S, incluindo os espaços internos transcritos ITS1 e ITS2, foi amplificada com os iniciadores (*primers*) descritos na literatura (Kane & Rollinson 1994; *Forward*: 5' TGC TTA AGT TCA GCG GGT 3'; *Reverse*: 5' TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA A 3'). As reações de PCR foram feitas em um volume final de 50 $\mu\text{L}$ , em 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 2,5 mM de cada dNTP, 5% DMSO, 1 U Taq DNA polimerase e 0,3  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, usando aproximadamente 100ng de DNA genômico como molde. O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguida por 32 ciclos, compostos por desnaturação a 94 $^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, anelamento a 60 $^{\circ}$  por 1 minuto e alongamento a 72 $^{\circ}$  por 2 minutos seguidos por um passo de alongamento final a 72 $^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos.

O gene da COI foi amplificado com os *primers* HCO2198: 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3' e LCO1490: 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' (Folmer *et al.* 1994), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$  por 4 minutos, 25 ciclos com desnaturação a 94 $^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto, anelamento a 50 $^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e meio. Por fim, tem-se uma extensão final a 72 $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. A reação de PCR teve como volume final 50 $\mu\text{L}$ , em 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 2,5 mM de cada dNTP, 1 U Taq DNA polimerase e 1  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, usando aproximadamente 100ng de DNA genômico como molde. A qualidade das amplificações foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata (Sambrook & Russel 2001) e documentados através do scanner HP Scanjet 2200c.

### **Purificação e sequenciamento**

Os produtos amplificados pelas PCR foram purificados com PEG 8000 para a remoção de resíduos de nucleotídeos, primers e enzima, permitindo, assim, uma reação de sequenciamento de qualidade (Sambrook & Russel 2001).

Para cada indivíduo foram produzidas quatro seqüências, sendo duas no sentido *forward* e duas no sentido *reverse*, de acordo com método de Sanger (Sambrook & Russel 2001), em um seqüenciador MegaBace (*GE Healthcare*). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação PCR. Para fins de análise, a seqüência foi subdividida nas regiões do ITS1 e do 5.8S, com base no alinhamento comparativo com as seqüências de *Eisenia fetida* disponíveis no banco de dados (NCBI 2007), usando-se o software MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.* 2007).

## **Análise dos dados**

### *Gene rDNA 5.8S*

As sequências obtidas foram analisadas e agrupadas com programa computacional Phred-Phrap (Gordon *et al.* 1998), montando-se uma sequência consenso para cada indivíduo. Em seguida, todas as sequências consenso de cada indivíduo foram alinhadas e realizou-se uma conferência visual dos picos obtidos no sequenciamento. Desta maneira, foram identificados os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) e polimorfismos do tipo inserção/deleção (indels). Foram aceitos como polimórficos apenas aqueles sítios heterozigotos em mais de uma reação de sequenciamento e localizados em regiões com qualidade de sequências alta. Os arquivos foram exportados em formato FASTA, para a análise e construção de árvores filogenéticas no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007). Do banco de dados públicos do NCBI foram obtidas seqüências de outros invertebrados (Tabela II), como Oligochaetas, Polychaetas, Hirundinida, Gastropoda e Bivalvia, para o estudo de relações filogenéticas. A árvore filogenética foi construída pelo algoritmo de *Neighbor joining* (Saitou & Nei 1987), utilizando-se o método de distância-p e assumindo-se taxas evolutivas uniformes. A confiabilidade do resultado dessa topologia foi testada por *bootstrap* (1000 replicações) (Fig. 2).

### *Região do ITS1*

O mesmo procedimento de análise da qualidade de seqüências adotado para o gene 5.8S rRNA foi realizado para o ITS1 e os polimorfismos encontrados foram anotados para a construção de rede haplotípica. Esta foi feita utilizando-se o software Network 4.2.0.1, por meio do método de *Median-Joining* (Bandelt *et al.* 1999) (Fig. 3).

### *mtDNA COI*

Os dados iniciais foram analisados com os mesmos softwares usados para o gene rRNA 5.8S. A história evolutiva das seqüências produzidas juntamente com as dos organismos, obtidas em banco de dados do NCBI (Tabela III), foi inferida utilizando o método de *Neighbor Joining* (Saitou & Nei 1987) e o teste de *bootstrap* foi aplicado sob a condição de 1000 replicações (Fig. 4). A análise filogenética foi conduzida pelo programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007).

## **RESULTADOS**

### **Gene rDNA 5.8S**

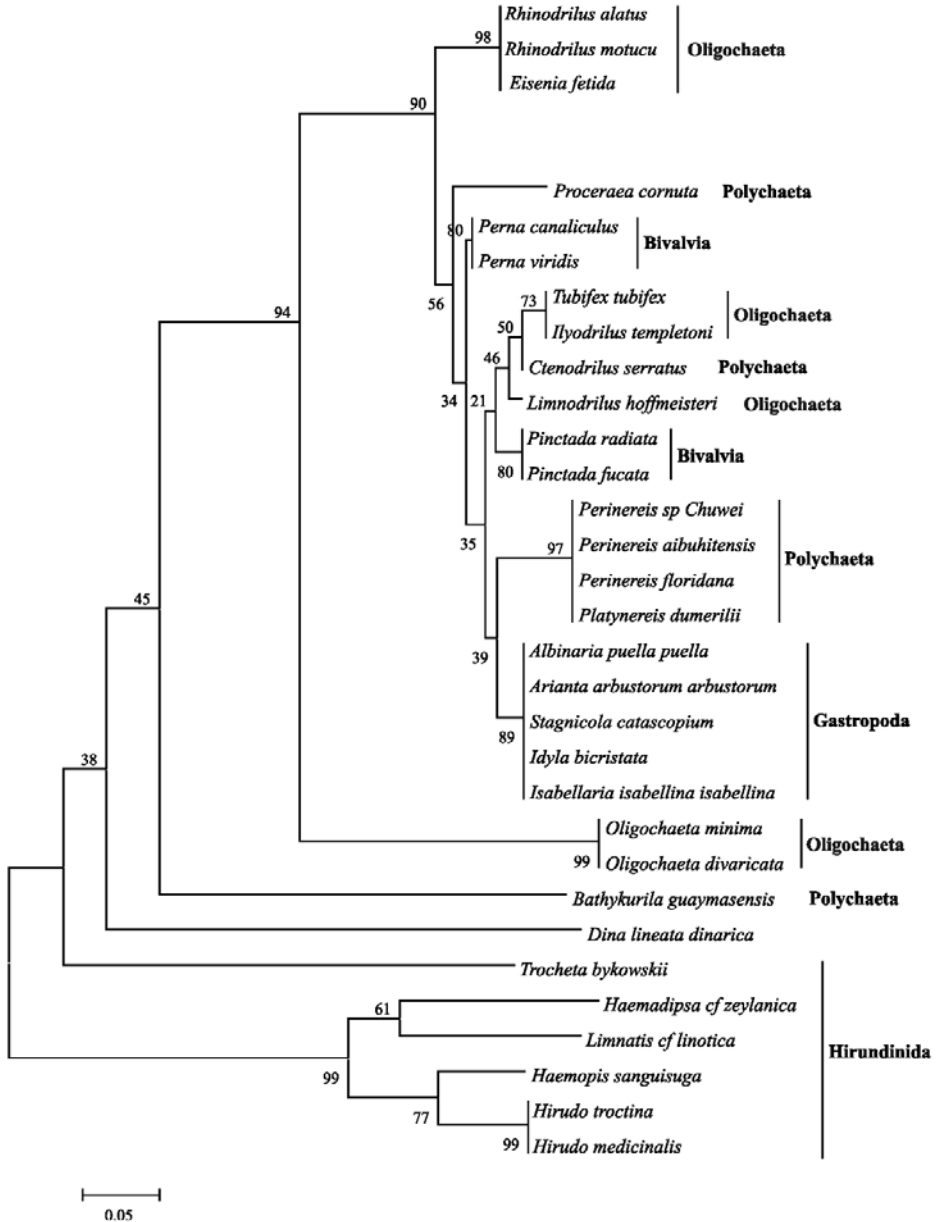
Obteve-se um total de 157 pares de bases com o sequenciamento dessa região correspondendo a sequência completa deste gene. Na árvore filogenética construída (Fig. 2), formou-se um grupo monofilético com todos os indivíduos de *R. alatus* (N = 45),

**Tabela II.** Relação de espécies para as quais foram obtidas sequências no banco de dados do NCBI para a construção de árvores filogenéticas para o gene rRNA 5.8S, com os respectivos números de acesso.

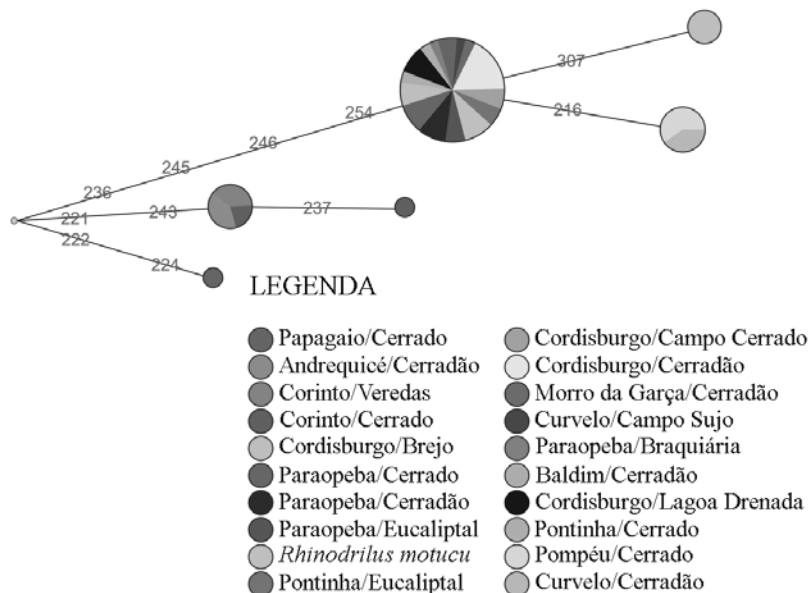
Espécie	Filo	Classe	Acesso no GenBank
<i>Eisenia fetida</i>	Annelida	Oligochaeta	EF534709
<i>Arianta arbustorum</i> <i>arbustorum</i>			AF124053
<i>Oligochaeta minima</i>			AY826307
<i>Oligochaeta divaricata</i>			AY826306
<i>Tubifex tubifex</i>			AF397152
<i>Ilyodrilus templetoni</i>			AF360993
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>			AF469007
<i>Ctenodrilus serratus</i>		Polychaeta	AY100446
<i>Platynereis dumerilii</i>			EF117908
<i>Bathykurila guaymasensis</i>			DQ074765
<i>Perinereis sp. Chuwei</i>			AF332167
<i>Perinereis floridana</i>			AF332157
<i>Perinereis aibuhitensis</i>			AF332152
<i>Proceraea cornuta</i>			AF212165
<i>Haemopsis sanguisuga</i>		Hirundinida	AY425381
<i>Haemadipsa cf. zeylanica</i>			AY763165
<i>Hirudo troctina</i>			AY763164
<i>Limnatis cf. nilotica</i>			AY763161
<i>Hirudo medicinalis</i>			AY786451
<i>Trocheta bykowskii</i>			AF169372
<i>Dina lineata dinarica</i>			AF169369
<i>Isabellaria isabellina isabellina</i>	Mollusca	Gastropoda	AF254618
<i>Albinaria puella puella</i>			AY728370
<i>Idyla bicristata</i>			AF254616
<i>Stagnicola catascopium</i>			AF013143
<i>Perna canaliculus</i>		Bivalvia	DQ924556
<i>Perna viridis</i>			DQ924555
<i>Pinctada fucata</i>			AB205102
<i>Pinctada radiata</i>			AB205095
<i>Pinctada radiata</i>			AB205095
Total			29



**Figura 2.** Árvore filogenética pelo algoritmo de NJ construída com base nas sequências de genes de rRNA 5.8S, com todos os indivíduos das espécies *R. alatus* e *R. motucu* estudados, além de sequências obtidas no banco de dados, referidas na Tabela III. Os valores de *bootstrap* se encontram próximos aos ramos.



**Figura 3.** Rede haplotípica construída com base nas variações de sequência da região ITS1, de todos os *R. alatus* e *R. motucu* estudados. Os números sobre os ramos indicam a posição polimórfica e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos.



todos *R. motucu* (N = 3) e com a *E. fetida*, suportado por um alto valor de *bootstrap* (= 98). As sequências de *R. alatus* e *R. motucu* foram idênticas, diferindo das de *E. fetida* em apenas uma posição. Entretanto, os demais clados obtidos são inconsistentes do ponto de vista evolutivo, uma vez que as classes de Annelida e Mollusca agruparam-se desordenadamente, discordando muito das relações filogenéticas aceitas atualmente.

### Região do ITS1

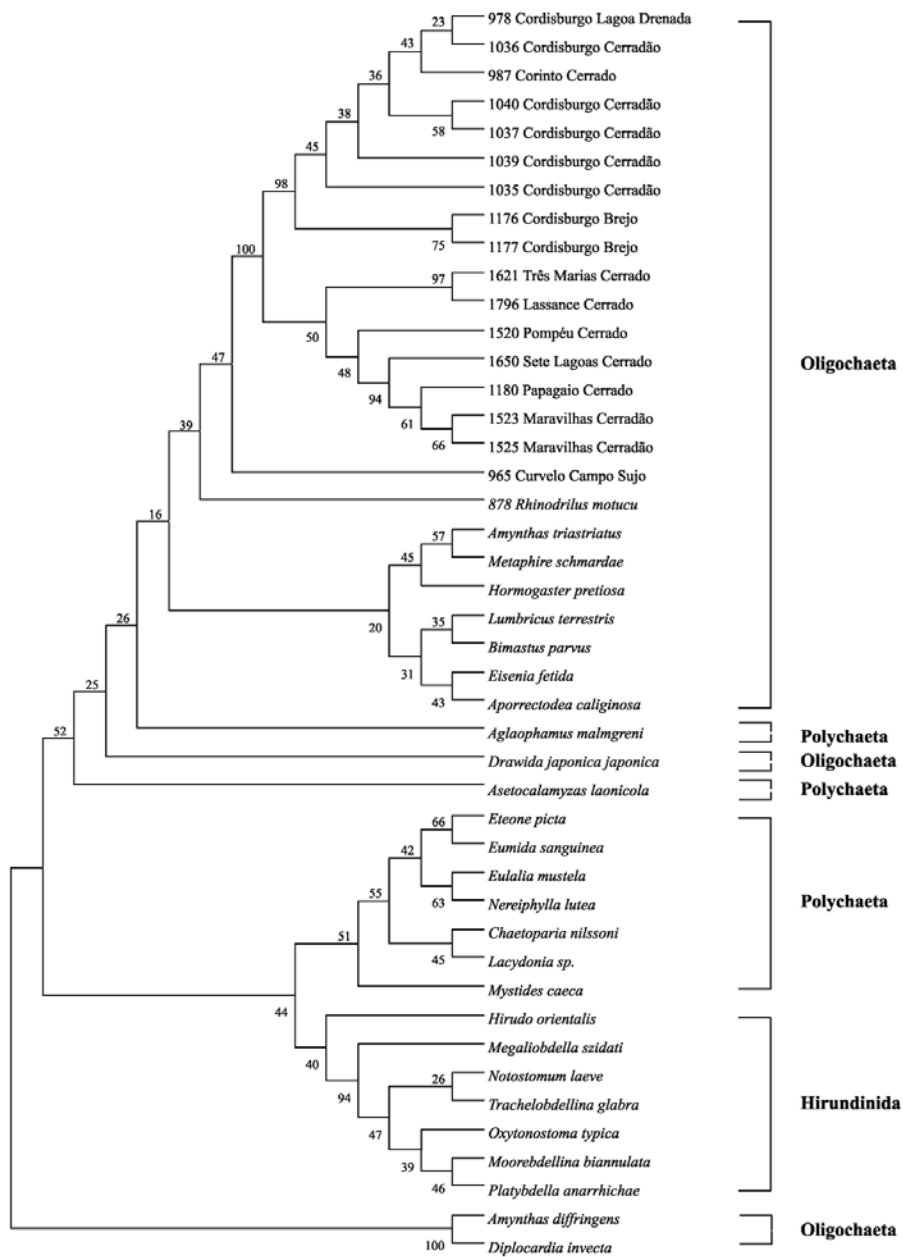
Na região sequenciada para *R. alatus* e *R. motucu*, com 482 pares de bases, foram identificados 11 sítios polimórficos, sendo 4 INDELS, 4 transversões e 3 transições. Com base nestas variações de sequências foram estabelecidos 9 haplótipos (Tabela IV).

A rede haplotípica construída (Fig. 3) mostra um suposto ancestral originando três grupos distintos, sendo o haplótipo mais freqüente (32 indivíduos) separado pelas posições 236, 245, 246 e 254. Este, por sua vez, se ramifica em dois subgrupos, sendo um identificado pela posição 307, englobando a população de Cordisburgo/Brejo, e o outro pela posição 216, agrupando toda população de Pompéu/Cerrado e Curvelo/Cerradão. O segundo grupo derivado do ancestral putativo difere-se pelas posi-

**Tabela III.** Relação de espécies para as quais foram obtidas sequências no banco de dados do NCBI para a construção de árvores filogenéticas para o gene mtDNA COI, com os respectivos números de acesso.

Espécie	Classe	Acesso no GenBank
<i>Amyntas diffringens</i>	Oligochaeta	EF077550
<i>Diplocardia invecta</i>		DQ257318
<i>Hormogaster pretiosa</i>		EF653907
<i>Asetocalamyzas laonicola</i>		EF569205
<i>Eisenia fetida</i>		EF077596
<i>Lumbricus terrestris</i>		DQ092908
<i>Amyntas triastriatus</i>		EF077607
<i>Metaphire schmardae</i>		EF077536
<i>Bimastus parvus</i>		EF077605
<i>Aporrectodea caliginosa</i>		EF077606
<i>Drawida japonica japonica</i>		EF077600
<i>Aglaophamus malmgreni</i>	Polychaeta	AY996126
<i>Chaetoparia nilsoni</i>		AY996125
<i>Eteone picta</i>		AY996124
<i>Eulalia mustela</i>		AY996123
<i>Eumida sanguinea</i>		AY996121
<i>Lacydonia sp.</i>		AY996120
<i>Nereiphylla lutea</i>		AY996118
<i>Mystides caeca</i>		AY996119
<i>Hirudo orientalis</i>	Hirundinida	EF405599
<i>Moorebdellina biannulata</i>		EF405598
<i>Trachelobdellina glabra</i>		EF405597
<i>Oxytonostoma typica</i>		EF405596
<i>Notostomum laeve</i>		EF405595
<i>Platybdella anarrhichae</i>		EF405594
<i>Megaliobdella szidati</i>		EF405593
Total		26

**Figura 4.** Árvore filogenética pelo algoritmo de NJ construída com base nas seqüências de mtDNA COI, com todos os indivíduos das espécies *R. alatus* e *R. motucu* estudados, além de seqüências obtidas no banco de dados. Os valores de *bootstrap* se encontram próximos aos ramos.



**Tabela IV.** Haplótipos e polimorfismos da região ITS1 de *minhocuçu R. alatus* de diferentes localidades de Minas Gerais.

Localidade	N	216	221	222	224	236	237	243	245	246	254	307
Demais	32	AA	**	GG	AA	GG	CC	GG	**	**	**	TT
Cordisburgo/Brejo	3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	TC
Cordisburgo/Brejo	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	CC
Papagaio/Cerrado	1	...	...	CC	CC	TT	...	...	+T	+C	+G	...
Pompéu/Cerrado	3	GG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Curvelo/Cerradão	2	GG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Andrequicé/Cerradão	2	...	+C	...	...	TT	...	AA	+T	+C	+G	...
Corinto/Cerrado	2	...	+C	...	...	TT	CA	AA	+T	+C	+G	...
Corinto/Veredas	2	...	+C	...	...	TT	...	AA	+T	+C	+G	...
Total	48											

ções 221 e 243 e contém as populações de Andrequicé/Cerradão, Corinto/Veredas e Corinto/Cerrado, sendo que essa última localidade forma-se um pequeno subgrupo identificado pela divergência na posição 237. Por fim, o último grupo difere-se pelas posições 222 e 224, contendo apenas um indivíduo da população de Papagaio/Cerrado.

É importante ressaltar, que os três indivíduos da espécie *R. motucu*, coletados em Goiás, apresentam o haplótipo mais freqüente entre os *R. alatus* de Minas Gerais. Estes resultados mostram que não há, novamente, evidências moleculares de que se tratem de espécies diferentes.

### mtDNA COI

O sequenciamento obtido gerou um amplicon de 634 pares de bases e um total de 185 sítios variáveis. De modo geral, a topologia da árvore filogenética (Fig. 4) mostrou-se mais adequada do que a obtida em rRNA 5.8S, agrupando em clados distintos as diferentes classes de Anellida. Todos os indivíduos *R. alatus* agruparam-se em um mesmo ramo, e a espécie mais próximas a este ramo foi a *R. motucu*. É importante ressaltar que não foi possível gerar árvores com sequências de organismos de outros filos devido à grande divergência genética. Novamente, *R. motucu* mostrou-se próximo evolutivamente dos minhocoçus *R. alatus* avaliados no presente estudo.

## DISCUSSÃO

Estudos recentes de sistemática molecular têm demonstrado que, em função de taxas evolutivas diferentes, certos genes (ou regiões do DNA) são mais apropriados do que outros para a reconstrução de relações evolucionárias entre táxons, em um nível particular de divergência (Simon *et al.* 1994). Sequências de DNA não-codificante são mais variáveis do que regiões codificantes e seu uso têm se mostrado mais apropriado para discriminação de níveis taxonômicos mais próximos (Smith & Klein 1994, Salvolainen *et al.* 1997). Através deste trabalho buscou-se esclarecer, baseado no sequenciamento do gene do rRNA 5.8S, do ITS1 e da mtDNA COI, as relações filogenéticas de minhocoçus distribuídos em municípios do cerrado central de Minas Gerais. A primeira etapa foi a avaliação de diferentes genes, uma vez que não há estudos moleculares sobre minhocoçus publicados ou mesmo sequências depositadas em bases de dados.

A região codificadora do rRNA 5.8S é pequena e altamente conservada e pode não permitir caracterização de espécie (Jorgenson & Cluster 1988), embora tenha demonstrado informações relevantes para análises filogenéticas em escala basal (Hershkovitz & Lewis 1996). Conforme os resultados obtidos, esse gene demonstrou um alto grau de conservação entre os indivíduos de *R. alatus*, *R. motucu* e *E. fetida*, mostrando uma evolução lenta nesse gene, mesmo em espécies de famílias distintas.

Por outro lado, os clados formados a partir de sequências de rDNA 5.8S do banco de dados não mostraram uma topografia condizente com a taxonomia tradicional. Tal fato sugere taxas evolutivas diferentes entre diferentes espécies para esse gene, ou até mesmo artefato, já que não se pode aferir qualidade às sequências depositadas em bancos de dados públicos. Entretanto, diferentes taxas evolutivas foram descritas para o gene da subunidade 18S do complexo de rRNA (Martin *et al.* 2000).

Outros fatores podem contribuir para a construção de árvores filogenéticas incorretas utilizando-se dados moleculares. Dentre os problemas encontrados pode-se citar a retenção de similaridades resultante de polimorfismos conservados de um ancestral e a perda de informações devido a substituições múltiplas de um único sítio (Simon *et al.* 1994). Por outro lado, a análise molecular oferece a vantagem de ser uma investigação direta da constituição genotípica, permitindo a detecção da variação em nível de DNA. De acordo com a metodologia adotada, as ferramentas moleculares podem ser mais sensíveis na detecção da diversidade genética, podendo complementar os métodos clássicos baseados em caracterização morfológica (Buso 2005).

Foi usado o método de *neighbor joining*, que segundo Nei (1996), produz a mesma topologia das árvores construídas com o método de *minimum evolution*, quando o número de nucleotídeos analisados é grande (>500), ou quando a quantidade de variação é grande, e se há diferenças, elas são geralmente estatisticamente não-significantes. Além disso, o autor destaca que distância *p* ou medidas de distâncias simples como Jukes-Cantor tendem produzir topologias adequadas, até mesmo mais que medidas de distâncias sofisticadas, quando a quantidade de variações é grande, como no caso do gene da citocromo oxidase.

Os espaços internos transcritos (ITS1 e ITS2) separam os genes rDNA 18S, 5.8S e 28S. As regiões do ITS de rDNA têm mostrado evoluir rapidamente, sendo úteis em inferências filogenéticas em nível de gênero e intragênero em plantas (Baldwin 1992), em nível de espécies em peixes (Stepien *et al.* 1993) e em nível inter- e intra-específico para *Bivalvia* (King *et al.* 1999). Além disso, Hershkovitz & Lewis (1996) identificaram na região ITS uma ferramenta evolutiva a ser explorada em organismos próximos e distantes, fornecendo *insights* sobre a evolução de sequências de DNA em geral. A rede haplotípica obtida nesse estudo corrobora a idéia de evolução rápida dessa região, já que foram encontradas variações abundantes entre os minhocuços analisados. O haplótipo mais freqüente está presente em vários municípios. Apenas alguns dos haplótipos mais raros aparecem em apenas uma localidade. Entretanto, em função de sua baixa freqüência, seriam necessários estudos adicionais para esclarecer se estes são realmente haplótipos privados de populações específicas.

O DNA mitocondrial tem sido um marcador molecular escolhido para reconstruir modelos históricos de demografia populacional, migrações, biogeografia e especiação (Hurst & Jiggins 2005). Sequências nucleotídicas ou de aminoácidos, ordem dos genes mitocondriais, estrutura secundária de RNA's transportadores e desvios no

código genético universal foram anteriormente utilizados em análises filogenéticas. Além disso, sequências únicas de genes ou a região controle mitocondrial tem comprovado ser úteis em estudos de genética de populações e de eventos de especiação (Bleidorn *et al.* 2006).

Dentre as vantagens do DNA mitocondrial destacam-se a facilidade em ser amplificado em diferentes táxons e, por ser haplóide, sua sequência pode ser facilmente obtida sem clonagem. Devido à sua alta taxa evolutiva o mtDNA permite resgatar o modelo de eventos históricos recentes, sem grande esforço em sequenciamento. Por último, sendo uma área com pouca recombinação, a molécula inteira pode ser assumida como tendo a mesma história genealógica (Hurst & Jiggins 2005).

Embora o mtDNA tenha a tendência de acumular mutações mas rapidamente do que algumas regiões nucleares, o gene codificador de proteínas COI apresenta tipicamente variação específicas (Tavares & Baker 2008). King *et al.* (1999) descreveram variação intraespecífica limitada em *Lasmigona subviridis*, mas entre as espécies deste gênero há grande diferenciação genética. As sequências produzidas para este gene entre os minhocoçus, mostraram abundante variação intra e interespecífica.

Outro aspecto questionado por esse estudo é se realmente todos os indivíduos coletados no cerrado central de Minas Gerais são da espécie *R. alatus*, já que a literatura descreve uma distribuição mais restrita (Drumond *et al.* 2007). Nesse contexto, a análise filogenética pode elucidar o status de um táxon e ajudar a alcançar o objetivo de proteger entidades distintas geneticamente e evolutivamente, podendo também mostrar as reais prioridades para alocação de esforços (Andreasen 2005). O manejo efetivo de espécies em risco pode ser complicado devido à inexistência de informação taxonômica adequada da espécie (King *et al.* 1999). Técnicas moleculares (primariamente, sequenciamento de DNA) têm transformado a habilidade dos cientistas de descrever e definir a diversidade biológica, sendo, aliadas a outros tipos de dados, ferramentas fundamentais para descrição de espécies crípticas. Espécies crípticas requerem uma atenção especial no planejamento de conservação devido a dois problemas: espécies já consideradas extintas ou ameaçadas podem ser compostas de múltiplas espécies, que são até mesmo mais raras do que previamente suposto; e, diferentes espécies podem requerer diferentes estratégias de conservação (Blickford *et al.* 2006). No presente estudo, o sequenciamento do gene rDNA 5.8S não auxiliou na separação das espécies estudadas (*R. alatus* e *R. motucu*), pois não mostrou nenhuma variação. Já o ITS1, em função da abundante variação intraespecífica, mostrou-se útil na separação de algumas subpopulações. Entretanto, o ITS1 também não foi capaz de separar as espécies estudadas (*R. alatus* e *R. motucu*), uma vez que *R. motucu* apresenta o haplótipo mais comum presente em *R. alatus*.

Uma profunda compreensão das relações filogenéticas de *R. alatus* é essencial para prover informações necessárias para o acesso do status de espécie e para o planejamento, implantação e monitoramento de programas de manejo e uso sustentável.



De acordo com os resultados obtidos nessa fase do estudo, faz-se necessário investigar outros genes, como o ITS2 e os rDNA 18S e rDNA 28S, para melhor esclarecimento das relações filogenéticas do minhocoçu, bem como para avaliar o quanto a espécie foi impactada pela atividade extrativista exacerbada. Estudos futuros também incluirão a investigação de correlação entre distribuição geográfica vs. haplótipos, e haplótipos vs. variações morfológicas, que estão sendo coletadas para esses animais (comprimento, diâmetro do animal, diâmetro da galeria).

Em conclusão, o gene do rDNA 5.8S se mostrou conservado, não tendo sido observadas variações entre os indivíduos testados de *R. alatus* e *R. motucu*. Essa sequência foi a mesma encontrada nas bases de dados para *E. fetida*, sugerindo uma forte conservação entre estas espécies. A região ITS1 mostrou-se polimórfica em *R. alatus*, podendo ser utilizada, associada a outros marcadores moleculares, em estudos de Genética de Populações, aplicando-se a conservação e uso sustentável da espécie. O gene mtDNA pode conter informações filogenéticas relevantes, sendo também fundamental, associado aos outros genes nucleares, para estudos de filogenia e genético-populacionais.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Conservação Internacional do Brasil, pelo suporte financeiro concedido.

### LITERATURA CITADA

- Andreasen, K.** 2005. Implications of molecular systematic analyses on the conservation of rare and threatened taxa: contrasting examples from Malvaceae. *Conservation Genetics*. 6: 399-412.
- Baldwin, B. G.** 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1: 3-16.
- Bandelt, H. J., P. Forster & A. Röhlmo.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16(1): 37-48.
- Beauchamp, K. A., R. D. Kathman, T. S. McDowell & R. P. Hedrick.** 2001. Molecular phylogeny of the tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19(2): 216-224.
- Bleidorn, C., L. Podsiadlowsky & T. Bartolomaeus.** 2006. The complete mitochondrial genome of the orbiniid polychaete *Orbinia latreillii* (Annelida: Orbiniiidae) – A novel gene order for Annelida and implications for annelid phylogeny. *Gene*. 370: 96-103.
- Blickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. L. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram & I Das.** 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 22(3): 148-155.
- Buso, G. S. C.** 2005. *Marcadores moleculares e análise filogenética*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Série Documentos No. 136. CENARGEN, Brasília.
- Campos, V. M. C.** 2007. *Criação de minhocoçu*. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. CE-TEC. <http://www.sbrt.ibict.br>.

- Cho, P. Y., S. J. Cho, M. S. Lee, J. A. Lee, E. S. Tak, C. Shin, J. K. Choo, S. C. Park, K. S. Lee, H. Y. Park & C. B. Kim. 2004. A PCR-Based analysis of Hox genes in an earthworm, *Eisenia andrei* (Annelida: Oligochaeta). *Biochemical Genetics*. 42(5/6): 209-216.
- Drumond, M. A., S. H. C. Campos, A. Q. Guimarães, R. P. Martins, L. C. Giovanetti & M. Mat-teuzo. 2007. Distribuição geográfica do minhocoçu *Rhinodrilus alatus*, Righi 1971 e sua contribuição para a revisão do status de conservação da espécie. In: *VIII Congresso de ecologia do Brasil*. São Paulo, 2007, Anais. Caxambu, MG: Sociedade de Ecologia do Brasil.
- Drumond, M. A., S. H. C. Campos, A. Q. Guimarães & J. T. Nunes. 2008. Uso e conservação do minhocoçu *Rhinodrilus alatus*. *MG Biota*. 1: 5-23.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294-299.
- Fröblius, A. C. & E. C. Seaver. 2006. ParaHox gene expression in the polychaete annelid *Capitella* sp. I. *Development Genes and Evolution*. 216: 81-88.
- Gordon, D., C. Abajian & P. Green. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*. 8 (3): 195-202.
- Hershkovitz, M. A. & L. A. Lewis. 1996. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Molecular Biology and Evolution*. 13(9): 1276-1295.
- Hurst, G. D. D. & F. M. Jiggins. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 272(1572): 1525-1534.
- Jamieson, B. G. M., S. Tillier, A. Tillier, J. L. Justine, E. Ling, S. James, K. McDonald & A. F. Hugall. 2002. Phylogeny of the Megascolecidae and Crassicitellata (Annelida: Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. *Zoosystema*. 24(4): 707-734.
- Jorgensen, R. & P. Cluster. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75: 1238-1247.
- Kane, R. A. & D. Rollinson. 1994. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 63: 153-156.
- King, T. L., M. S. Eackles, B. Gjetvaj & W. R. Hoeh. 1999. Intraspecific phylogeography of *Lasimigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. *Molecular Ecology*. 8:65-78.
- Kojima, S. 1998. Paraphyletic status of Polychaeta suggested by phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of Elongation Factor-1 $\alpha$ . *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9(2): 255-261.
- Machado, A. B., C. S. Martins & G. M. Drummond. 2005. *Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Martin, P., I. Kaygorodova, D. Y. Sherbakov & E. Verheyen. 2000. Rapidly evolving lineages impede the resolution of phylogenetic relationships among Clitellata (Anellida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 15(3): 355-368.
- Miller, A.S., D. D. Dykes & H. F. Poleski. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215.
- Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annual Reviews in Genetics*. 30: 371-403.
- NCBI. 2008. *National Center for Biotechnology Information*. United States of America. www.ncbi.nlm.nih.gov.

- O'Brien, S. J.** 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 5748-5755.
- Pop, A. A., M. Wink & V. V. Pop.** 2003. Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia*. 47: 1-6.
- Righi, G.** 1971. Sobre a família Glossoscolecidae (Oligochaeta) no Brasil. *Arquivos de Zoologia*. 20(1): 1-95.
- Righi, G.** 1998. Oligoquetas. Pp. 571-583. In: A.B.M. Machado, G.A.B. da Fonseca, R.B. Machado, L.M. de S. Aguiar and L.V. Lins (Eds.). *Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais*. Fundação Biodiversitas. Belo Horizonte.
- Römbke, J., S. Jänsch & W. Didden.** 2005. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 62: 249-265.
- Rupert, E. E., R. S. Fox & R. D. Barnes.** 2005. *Zoologia dos Invertebrados*. 7ª ed. Roca, São Paulo.
- Saitou, N. & M. Nei.** 1987. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-25.
- Salvolainen, V., R. Spichiger & J. F. Manen.** 1997. Polyphyletism of Celestrales deduced from a chloroplast noncoding DNA region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 7: 145-157.
- Sambrook, J. & D. W. Russel.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu & P. Flook.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87(6): 651-700.
- Smith, D. & A. S. Klein.** 1994. Phylogenetic inferences on the relationships of North American and European *Picea* species based on nuclear ribosomal 18S sequences and the internal transcribed spacer region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 3: 17-26.
- Stepien, C. A., M. T. Dixon & D. M. Hillis.** 1993. Evolutionary relationships of the blennioid fish families Clinidae, Labrisomidae, and Chaenopsidae: congruence between DNA sequence and allozyme data. *Bulletin of Marine Science*. 52: 496-515.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- Tavares, E. S. & A. J. Baker.** 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology*. 8: 81-95.