

COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Acromyrmex heyeri*

COMPARISON OF PROTOCOLS FOR DNA EXTRACTION OF *Acromyrmex heyeri*

GRUTZMACHER, Douglas D.¹; ZIMMER, Paulo D.²; OLIVEIRA, Antonio C.³; LOECK, Alci E.⁴; FISCHER, Sintia⁵; ELIAS, Sandro A.⁵; VARGAS, Carla C. J.⁶

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar quatro protocolos de extração de DNA para formigas, verificando o efeito do período de armazenamento em álcool sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído. Foram utilizados quatro protocolos (I; II; III e IV) para extração de DNA de *Acromyrmex heyeri*, armazenadas em álcool 75% à temperatura ambiente por um período de 0, 16, 32 e 64 meses. A amplificação do DNA extraído nos quatro protocolos testados, foi efetuada através da técnica de PCR. Os quatro protocolos testados podem ser utilizados para extração de DNA de formigas não armazenadas em álcool, no entanto, para formigas armazenadas por até 16 meses em álcool, a extração foi possível apenas pelos protocolos I e IV. Já a extração de DNA de formigas armazenadas por um período igual ou superior a 32 meses não foi possível. Os primers utilizados (UBC 391 e UBC 396) amplificaram o DNA extraído em todos protocolos para as formigas não armazenadas, não ocorrendo o mesmo para formigas armazenadas. Observando-se o custo e rapidez o melhor protocolo foi o protocolo I, no entanto, bandas mais consistentes foram obtidas com DNA extraído pelo protocolo III.

Palavras-chave: Formiga cortadeira, DNA e PCR.

No Rio Grande do Sul as principais formigas cortadeiras pertencem ao gênero *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns). Ambas cortam plantas e transportam os tecidos vegetais para os formigueiros onde, em câmaras especiais, são utilizados como meio de cultura para cultivo de um fungo, do qual se alimentam. Segundo GRUTZMACHER (2000)

Acromyrmex heyeri é a espécie mais freqüente na região Sul do Rio Grande do Sul. Esta espécie representa 31% do total das formigas cortadeiras, ocorrendo principalmente em pastagens nativas em 96% dos municípios, o que causa grande prejuízo aos pecuaristas desta região.

Para a identificação das espécies de *Atta* são utilizados indivíduos da casta dos soldados, o que torna o processo mais fácil. Em *Acromyrmex* essa casta não ocorre, sendo por isso utilizado os maiores indivíduos encontrados o que pode gerar dúvidas e confusões (JUSTI JUNIOR et al., 1996). Presume-se que estudos baseados em análises de DNA possam auxiliar na identificação.

Marcadores de DNA têm sido utilizados para estudos de diversidade genética em várias espécies animais e vegetais (WALDSCHMIDT, 1997), sendo que seu uso, tem revolucionado e resolvido importantes problemas em espécies pouco estudadas. A análise com marcadores em espécies pouco estudadas enfrenta barreiras no processo de extração de DNA. Para se obter um DNA com qualidade, diferentes protocolos precisam ser testados.

Nesse sentido foram testados quatro métodos de extração de DNA de *A. heyeri* visando eleger o melhor método de extração para essa espécie, considerando-se o efeito do período de armazenamento das formigas em álcool sobre a quantidade e a qualidade do material genético obtido, bem como as questões relativas ao custo, tempo para obtenção do DNA e agressividade ao meio ambiente.

¹ Eng. Agr. Aluno de Pós Graduação em Fitossanidade DFS/FAEM/UFPel. Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP 96.010-900. E.mail; douglasgrutzmacher@bol.com.br

² Eng. Agr. Dr. Pesquisador do Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento LGF/DFT/FAEM/UFPel. Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP 96.010-900.

³ Eng. Agr. Dr. Prof. Adjunto DFT/FAEM/UFPel. Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP 96.010-900.

⁴ Eng. Agr. Dr. Prof. Titular DFS/FAEM/UFPel. Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP 96.010-900.

⁵ Acadêmico de Agronomia FAEM/UFPel. Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP 96.010-900.

⁶ Niológa M.Sc. UFPel. Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP 96.010-900.

(Recebido para publicação em 08/05/2002)

Foram utilizadas formigas da espécie *A. heyeri* coletadas em quatro períodos diferentes e mantidas em álcool 75% a temperatura ambiente. As formigas armazenadas foram coletadas por técnicos da EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural) e encontram-se armazenadas em pequenos recipientes de vidro no Museu Entomológico "Ceslau Biezanko" da Universidade Federal de Pelotas. Os períodos de armazenamento em álcool foram: 0 (formigas não armazenadas), 16, 32 e 64 meses.

Para verificar a possibilidade da amplificação de seqüências do DNA extraído nos quatro protocolos testados, através da técnica de RAPD e dos quatro períodos de armazenamento, foram testados 2 primers (UBC 391 e UBC 396) selecionados a partir de um teste preliminar, no qual testou-se 20 primers.

Para cada um dos protocolos testados foram realizadas oito extrações correspondentes a quatro períodos de armazenamento e duas repetições. Os protocolos utilizados foram os seguintes:

Protocolo I (OLERUP & ZETTERQUIST, 1994): As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e ressuspendidas em 500 µl de tampão de extração (Tris HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,5%) adicionada de proteinase K (20 µg/ml). Posteriormente as amostras foram incubadas por duas horas a 37°C e centrifugadas por 6 minutos a 14.000 g. Ao sobrenadante foram adicionados 260 µl de TE, 240 µl de NaCl 5M e centrifugado por 15 minutos a 14000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo (500 µl) ao qual foi adicionado 2 vezes o volume em etanol e homogenizado, seguida de centrifugação por 15 minutos a 14000 g. O precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação por cinco minutos a 14000 g e ressuspensão do precipitado em 50 µl de TE pH 8,0.

Protocolo II (BELSHAW & QUICKE, 1997): Em um eppendorff foram colocados 500 µl de solução de NaCl 5 M e adicionados 0,5 µl de proteinase K (20 µg/ml). Em cada eppendorff colocaram-se 5 formigas que foram lavadas em álcool e maceradas com a solução. Permaneceram incubando a 37 ° C por 18 horas. Retiraram-se o sobrenadante para outro tubo e adicionaram-se 250 µl de acetato de sódio/etanol 76 %. Centrifugaram-se por 10 minutos a 13000 g. Descartaram-se o sobrenadante e adicionaram-se 50 µl de TE (PH 8,0).

Protocolo III (SAGHAI-MAROOF, 1984): Consistiu na maceração das amostras com nitrogênio líquido e posterior extração com 375 µl CTAB 2% adicionado de 0,96% de β-mercaptoetanol (v/v) aquecidos por 30 minutos a 65°C. Após resfriadas as amostras receberam 187,5 µl de solução de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) ficando sob agitação por 15 minutos e posteriormente centrifugadas a 4000 g. Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol na proporção de 80% (v/v) centrifugado a 13000 g por 5 minutos e desprezado o sobrenadante. O DNA foi lavado por 20 minutos em 100 µl de solução de acetato de sódio 0.2 M em etanol 76%; centrifugado por 1 minuto a 13000 g, lavado com 100 µl de solução de acetato de amônia 10 mM em etanol 76%;

centrifugado por 2 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 50 µl de TE pH 8.0.

Protocolo IV (SAMBROOK et al., 1989): As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido; adicionados 2,5 µl de proteinase K (20 µg/ml) e 500 µl de solução (125 mM EDTA, 500 mM Tris pH 8.0 e 2,3 % SDS) e aquecido por uma hora a 37°C. Foi adicionado 1 volume de fenol; homogeneizado por 15 minutos e centrifugado a 12000 g por 5 minutos. Coletada a fase aquosa, foi acrescentado o mesmo volume de fenol : clorofórmio; homogeneizado por 15 minutos; centrifugado por 5 minutos a 12000 g; coletada a fase aquosa e repetidos novamente os passos a partir do acréscimo de fenol : clorofórmio. O DNA foi precipitado pela adição de 0.1 volumes de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto e incubado a -20° C por 30 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12000 g; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em 50 µl de TE pH 8.0.

Após as extrações, o DNA genômico obtido a partir de todos os protocolos, foi analisado em eletroforese com gel de agarose 1 %. O DNA foi colorido com brometo de etídeo (SAMBROOK et al. 1989).

Os quatro protocolos testados foram eficientes na extração de DNA de *A. heyeri* não armazenadas. Somente foi possível a extração de DNA de formigas armazenadas em álcool por um período de até 16 meses pelos protocolos modificados de OLERUP & ZETTERQUIST, 1994 e SAMBROOK et al., 1989. Já a extração de DNA de formigas armazenadas por período superior a 16 meses não foi possível, provavelmente em razão da degradação do material genômico ao longo da estocagem.

Na Figura 1 é apresentado o DNA amplificado pela técnica de RAPD para os quatro protocolos testados, utilizando-se os primers UBC 391 (A) e UBC 396 (B). Observa-se que o DNA obtido com os quatro métodos com formigas não armazenadas permitiu a amplificação, porém o DNA extraído de formigas armazenadas por 16 meses não foi possível ser amplificado (colunas 4 e 5; 12 e 13).

Todos os protocolos apresentaram bandas de boa qualidade quando se utilizaram formigas não armazenadas, com pequena vantagem para o protocolo III.

Considerando-se fatores como custo, rapidez, praticidade e agressividade ao meio ambiente o melhor protocolo de extração de DNA de *A. heyeri* foi o protocolo I, que além de extrair boa quantidade de DNA, também teve menor custo, com menor tempo de extração e menor agressividade ao meio ambiente, em razão de não conter produtos tão tóxicos, como é o caso do fenol, utilizado no protocolo IV.

Além disso, sugerimos que seja feita uma análise com períodos de armazenamento entre "0" e 16 meses, para se conhecer o período exato de armazenamento, sem que ocorra degradação do DNA das formigas.

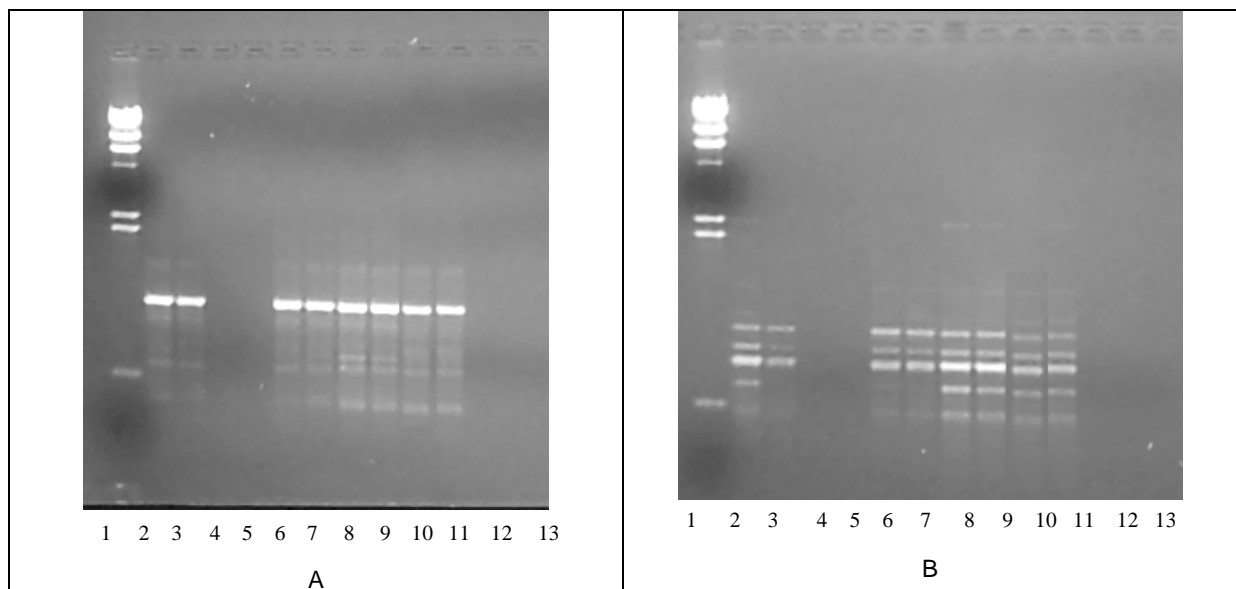


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do DNA obtido nos diferentes métodos de extração, utilizando-se os primers UBC 391 (A) e UBC 396 (B) Coluna 1- 1 µg de DNA lambda *Hind* III; Colunas 2 e 3, 6 e 7, 8 e 9, 10 e 11 – DNA de formigas não armazenadas em álcool, obtidas pelos métodos I, II, III e IV, respectivamente. Colunas 4 e 5, 12 e 13 – DNA de formigas obtidas pelos métodos I e IV (armazenadas por 16 meses em álcool).

ABSTRACT

The goal of this work was to compare four DNA extraction protocols, verifying the effect of the storage period in alcohol on the quality and quantity of extracted DNA. Four protocols were used (I; II; III and IV) for DNA extraction of *Acromyrmex heyeri*, stored in alcohol 75% at room temperature. Ants were stored for 0, 16, 32 and 64 months. The quality of the DNA extracted in all four protocols was verified through PCR. The four tested protocols may be used for ant DNA extraction from fresh tissue. However, for ants stored for 16 months in alcohol, DNA was only obtained by the protocols I and IV. DNA extraction of ants stored for 32 or more months was not possible. For DNA quality control two primers were tested, UBC 391 and UBC 396, which amplified fragments using DNA extracted with all protocols from fresh tissues. The same was not observed for stored ants. Considering cost and speed protocol I was the best, however, more consistent bands were observed in protocol III.

Key words: Cutting ant, DNA isolation, PCR

REFERÊNCIAS

BELSHAW, R.; QUICKE, D. L. J. A molecular Phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.7, n. 3, Ascot, United Kingdom. p. 281 – 293. 1997.

GRUTZMACHER, D. D. **Ocorrência de formigas cortadeiras em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul**.

Pelotas: UFPel, 2000. 112p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

JUSTI JUNIOR, J.; IMENES, S. L.; BERGMANN, E. C.; et al. **Formigas cortadeiras: Boletim Técnico**, Instituto Biológico n. 4, 1996, 31p.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence Specific primer (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-reipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, p. 225-235, 1994.

SAGHAI-MAROOFF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R.A; et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. Ed. New York: Cold Spring Laboratory, 9.16-9.23, 1989.

WALDSCHMIDT, A. M. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 421-423, 1997.