

EFEITO DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO EM ETANOL SOBRE A QUALIDADE E QUANTIDADE DE DNA EXTRAÍDO DE *Acromyrmex heyeri* (FOREL, 1899) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

EFFECT OF CONSERVATION TIME IN ETHANOL ON THE QUALITY AND QUANTITY OF DNA EXTRACTED FROM *Acromyrmex heyeri* (FOREL, 1899) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Douglas Daniel Grutzmacher¹; Alci Enimar Loeck²; Antonio Costa de Oliveira³; Sintia Fischer⁴; Sandro Al-Alam Elias⁴

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

A maioria das técnicas utilizadas nas análises moleculares requerem DNA de boa qualidade, não fragmentado. Assim, especial consideração deve ser dada à preservação das amostras. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído de formigas cortadeiras. Foram utilizadas formigas da espécie *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) mantidas em etanol 75% à temperatura ambiente por períodos de 1, 3, 5, 8 e 10 meses. Cada um destes períodos de armazenamento representou um tratamento, sendo utilizado um grupo de formigas não armazenadas, como controle. Os resultados mostraram que foi possível a extração de DNA nos diferentes períodos testados, porém, com formigas frescas a quantidade de DNA obtida foi maior. A degradação do DNA das formigas armazenadas em etanol ao longo do tempo pode ser a explicação para essa diferença de quantidade. Quando o DNA foi submetido à amplificação por RAPD observou-se que somente foi possível a amplificação do DNA das formigas armazenadas até 8 meses, período a partir do qual não houveram amplificações.

Palavras-chave: Formiga cortadeira, Degradação do DNA, PCR e RAPD.

ABSTRACT

Most of the molecular analysis techniques require DNA not fragmented and with good quality. Therefore, a special attention should be considered to samples conservation. This work evaluated the effect of conservation period in ethanol on the quality and quantity of DNA extracted from *Acromyrmex heyeri*. Treatments consisted of preserving ant samples in ethanol solution (75%), for 1, 3, 5, 8 or 10 months at environmental temperature. Fresh ants were used as control. Results showed that DNA can be successfully extracted from ants preserved from 1 to 10 months, although fresh ants yielded the highest amount of DNA. It is concluded that DNA can be degraded in long time conservation in ethanol. However, DNA was amplified in all treatments excepting for time longer than 8 months from which or no amplified products of PCR were produced of degraded bands.

Key words: Leaf cutting ants, DNA degradation, PCR, RAPD.

Os métodos morfológicos, tradicionalmente utilizados para identificação de insetos, apresentam muitas limitações em alguns grupos de insetos, tanto pela ambigüidade inerente ao seu uso como pela dificuldade de serem aplicados em alguns estádios de desenvolvimento do inseto. Isso tem motivado a aplicação de técnicas baseadas no estudo de marcadores genéticos, de utilização mais difícil, porém mais estáveis e objetivos (CENIS, 1994). Dentre esses métodos

destaca-se o emprego da análise de isoenzimas, através de eletroforese, que vem sendo utilizado para diversas espécies, desde o início dos anos 80.

Muitos trabalhos sobre sistemática de insetos já foram desenvolvidos empregando-se esta técnica. PAMILO et al. (1978), analisou a variabilidade isoenzimática em 15 espécies de abelhas e vespas coletadas em diferentes localidades.

Pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) pode-se analisar insetos mantidos em coleções ou até mesmo fósseis. PHILLIPS & SIMON (1995) ao desenvolverem a técnica de extração de DNA de insetos mantidos intactos em etanol ou em insetários, por muitos anos, utilizaram PCR para análise do DNA coletado.

A maioria das técnicas utilizadas nas análises moleculares requer DNA de boa qualidade, não fragmentado. Assim, especial consideração deve ser dada à preservação das amostras. Muitas vezes, existe dificuldade para manter o inseto vivo por longo período, surgindo a necessidade de armazenar os indivíduos de maneira adequada para evitar perdas de quantidade e qualidade do DNA (CARVALHO, 2000).

A preservação de insetos em etanol é uma prática padrão, sendo as amostras preservadas em via seca a – 70°C ou – 80°C ou etanol 70%, 95% ou 100% à temperatura ambiente (CARVALHO & VIEIRA, 2001).

CARVALHO (2000) verificou que espécies de formigas cortadeiras do gênero *Atta* armazenadas em etanol 95% à temperatura ambiente, por períodos superiores a 210 dias, apresentam DNA de baixa qualidade para análises RAPD, podendo levar a resultados não confiáveis.

Nesse sentido, foi verificado o efeito do período de armazenamento em álcool sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído. Foram utilizadas formigas da espécie *Acromyrmex heyeri* mantidas em álcool 75% à temperatura ambiente, armazenadas em etanol por períodos de 1, 3, 5, 8 e 10 meses. Cada um destes períodos de armazenamento representou um tratamento, sendo também utilizado um grupo de formigas não armazenadas, como controle. Para amplificação dos RAPDs utilizou-se o primer UBC 391 e o protocolo proposto por OLERUP & ZETTERQUIST (1994).

A Figura 1A mostra o resultado da extração de DNA das formigas nos diversos tratamentos. Observa-se que foi possível a extração de DNA nos diferentes períodos testados, porém, com formigas frescas conseguiu-se maior quantidade de DNA. Isto pode ser explicado pela degradação do DNA das

¹Eng. Agr. Dr. Bolsista PRODOC-Capes; E.mail: douglasdanielg@bol.com.br

²Eng. Agr. Dr. Prof. Titular Depto. de Fitossanidade FAEM/UFPEL Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP: 96.010-900.

³Eng. Agr. Dr. Prof. Adjunto Depto. de Fitotecnia FAEM/UFPEL Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP: 96.010-900.

⁴Acadêmicos de Agronomia FAEM/UFPEL Caixa Postal 354, Pelotas, RS. CEP: 96.010-900

formigas quando conservadas em etanol 75% ao longo do tempo. CARVALHO & VIEIRA (2001) citam que a quantidade de DNA íntegro em relação ao *primer* é um dos fatores fundamentais para o sucesso da reação de PCR, uma vez que poderá não ocorrer amplificação se a sua quantidade for excessivamente baixa ou alta. VANLERBERGHE-MASUTTI

(1994) verificou que nas espécies de insetos, as quantidades de DNA utilizadas nas reações tem oscilado entre 10 e 50 ng. CARVALHO (2000) verificou que para *Atta sexdens rubropilosa* a quantidade ótima de DNA para as reações de RAPD está entre 19 e 30 ng.

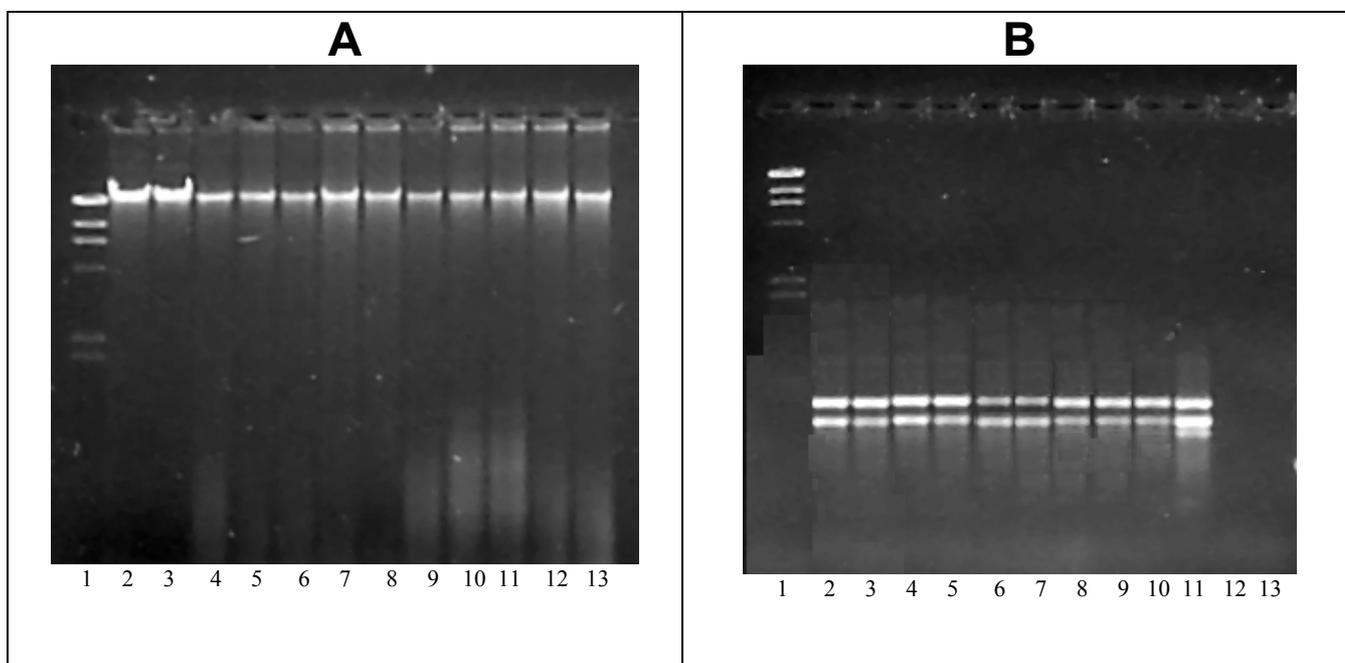


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico de *Acromyrmex heyeri* (A) e amplificação dos fragmentos por RAPD com o primer UBC 391(B) obtido pelo protocolo proposto por OLERUP & ZETTERQUIST (1994), com diferentes períodos de armazenamento, sendo Coluna 1- 1 µg de DNA lambda *Hind* III; Colunas 2 e 3 – formigas frescas; Colunas 4 e 5 – formigas armazenadas por 1 mês; Colunas 6 e 7 – formigas armazenadas por 3 meses; Colunas 8 e 9 – formigas armazenadas por 5 meses; Colunas 10 e 11 – formigas armazenadas por 8 meses e Colunas 12 e 13 – formigas armazenadas por 10 meses.

Os resultados mostraram que somente foi possível a amplificação do DNA das formigas armazenadas até 8 meses. A partir deste período não há amplificação por PCR-RAPD (Figura 1B).

Resultados semelhantes foram encontrados por CARVALHO (2000), que observou que até 210 dias, o DNA obtido de formigas do gênero *Atta* armazenadas em álcool 95% à temperatura ambiente apresentou boa resolução de bandas quando amplificado através da técnica RAPD, no entanto, quando armazenadas por período de 360 dias observou menor qualidade na amplificação de bandas.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, A.O.R. **Análise da variabilidade genética e identificação de espécies do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) por meio de marcadores moleculares.** Curitiba, 2000. 134p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná.
- CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.4, n.30, p.593-600, 2001.
- CENIS, J.L. Aplicación de la técnica RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar) a la identificación de insectos. **Ciencia e Investigación agraria. Producción y Protección Vegetales**, Santiago do Chile, v. 9, n.2, p. 289-297, 1994.
- 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-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, Parkville, v. 39, p. 225-235, 1994.
- PAMILO, P.; VARVIO-AHO, S.L.; PEKKARINEN, A. Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas**, Lund, v.88, p.93-99, 1978.
- PHILLIPS, A.J.; SIMON, C. Simple, efficient, and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v.88, n.3, p.281-283, 1995.
- VANLERBERGHE-MASUTTI, F. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. **Insect Molecular Biology**, Irvine, v.3, n.4, p.229-237, 1994.