

SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)

ALFREDO O.R. DE CARVALHO E LUIZ G.E. VIEIRA

Área de Proteção de Plantas, IAPAR, Caixa postal 481, 86001-970, Londrina, PR

Neotropical Entomology 30(4): 593-600 (2001)

Determination of Optimal Conditions for PCR-RAPD Analyses in *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)

ABSTRACT – PCR-RAPD has been widely used for genetic analysis in several organisms. However, due to complex interactions among the components of the PCR reaction it is unlikely that a single amplification condition can be suitable for all situations. In order to determine the optimum conditions for using PCR-RAPD in taxonomical analyses of the genus *Atta*, the following factors were tested: concentrations of MgCl₂, DNA, BSA, cycling programs and methods of DNA extraction, using Fractional Factorial Design and Central Composite Design. DNA extraction methods had little influence on PCR-RAPD reactions, while the cycling programs showed the largest effect. The MgCl₂ concentration was less important than the amount of DNA used in the reaction. Using cycling program P₂, a significant improvement in the number of DNA fragments was achieved when MgCl₂ concentration was increased to 3.0 mM and the BSA and DNA concentrations were reduced from 0.1% to 0.05% and from 2 to 1 ng/μl, respectively. The optimum conditions for PCR-RAPD with *Atta* specimens obtained in this study were: 25 μl reaction with 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 3.0 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 μM of each dNTP, 0.2 μM of primer, 1.0 U of *Taq* polymerase, 25 ng template DNA (extracted by Cheung's method) and BSA 0.05%, using the amplification program which consisted of 3 min at 94°C, 3 min at 35°C, followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 36°C and 2 min at 72°C, and a 5 min final extension at 72°C.

KEY WORDS: RAPD-PCR, optimization, DNA extraction, leaf-cutting ants.

RESUMO – A técnica PCR-RAPD tem sido amplamente empregada em estudos genéticos de populações de vários organismos. Entretanto, devido às interações entre os componentes da reação de PCR é improvável que uma única condição de amplificação possa ser adequada para todas as situações. Com o objetivo de determinar as condições ótimas para a utilização da técnica PCR-RAPD em análises taxonômicas do gênero *Atta*, foram analisados os fatores: concentrações de MgCl₂, DNA, BSA, programas de temperaturas e métodos de extração de DNA, utilizando-se os delineamentos Fatorial Fracionado e o Central Composto. Dentre os fatores avaliados, o método de extração de DNA teve pouca influência na reação, enquanto que o programa de temperatura apresentou o maior efeito. Embora a concentração de MgCl₂ seja importante para obtenção de um padrão exato de bandas, seu efeito foi menor do que a quantidade de DNA. Com o aumento da concentração de MgCl₂ para 3,0 mM e com a diminuição da concentração de BSA de 0,1% para 0,05% e da quantidade de DNA de 2 para 1 ng/μl ocorreu um aumento significativo no número de fragmentos amplificados, sendo esse efeito observado com maior evidência no programa P₂. As condições ótimas estabelecidas para as reações PCR-RAPD foram: 25 μl de solução contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 100 μM de cada dNTP, 0,2 μM de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase, 25 ng DNA (extraído pelo método Cheung) e BSA 0,05%, utilizando-se o programa de amplificação: 3 min. a 94°C, 3 min. a 35°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 36°C e 2 min. a 72°C, com extensão final de 5 min. a 72°C.

PALAVRAS-CHAVE: RAPD-PCR, otimização, extração de DNA, formiga saúva.

A técnica denominada PCR-RAPD (Reação da Polimerase em Cadeia - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), baseada na amplificação de DNA com um simples primer de 10 nucleotídeos, foi desenvolvida por Williams *et al.* (1990) para detectar polimorfismos genéticos. Os fragmentos de DNA produzidos servem para discriminar indivíduos, raças ou espécies, podendo assim ser empregados em diversos estudos que utilizam marcadores genéticos (Hardrys *et al.* 1992).

Entretanto, devido a um complexo de interações dos componentes da reação de PCR e às diferentes finalidades para as quais essa técnica é utilizada, um mesmo conjunto de condições de amplificação não é adequado para todas as situações e para diferentes espécies de insetos, havendo, portanto, a necessidade de se estabelecer *a priori* as condições ótimas de reação.

Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito das concentrações de magnésio, *Taq* polimerase, primers, DNA, deoxinucleotídeos (dNTPs) e também dos parâmetros: termociclador, programas de temperaturas (desnaturação, anelamento e extensão), número de ciclos e método de extração do DNA sobre a eficiência de amplificação de fragmentos de DNA de plantas, bactérias, fungos e nematóides em PCR-RAPD (Levi *et al.* 1993, Meunier & Grimont, 1993, Wolff *et al.* 1993, He *et al.* 1994, Liu & Berry, 1995, Boleda *et al.* 1996, Staub, 1996).

Para investigar a influência de diversos fatores sobre uma reação, basicamente dois métodos têm sido utilizados. O mais tradicional é aquele em que apenas um fator é testado a cada experimento, sendo os demais fatores fixados e trocados em sucessivos experimentos. O outro método, mais efetivo e mais eficiente, consiste dos delineamentos experimentais Fatorial Fracionado (DFF) e o Central Composto (DCC) propostos por Boleda *et al.* (1996). Esses delineamentos permitem modificar diversos fatores a cada vez, permitindo detectar a interação entre vários parâmetros. Mesmo que o número de variáveis seja alto, pode-se obter resposta individual para cada fator, com um número limitado de experimentos.

Este trabalho teve por objetivo determinar as condições ótimas para a utilização da técnica PCR-RAPD em análises taxonômicas das espécies do gênero *Atta*, através da avaliação de alguns dos parâmetros com maior influência na eficiência da reação, utilizando-se os delineamentos Fatorial Fracionado (DFF) e o Central Composto (DCC).

Material e Métodos

Como fonte de DNA, para evitar possível contaminação das amostras com DNA de ovos ou larvas de parasitóides, utilizou-se somente a cabeça de operária máxima (soldado) de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, coletadas em um único sauveiro, no município de Assis-SP. As formigas foram conservadas em etanol 95% à temperatura ambiente durante 15 dias, sendo as cabeças destacadas e secas a vácuo durante 20 min. antes da extração do DNA. Para cada método de extração, dez cabeças foram trituradas individualmente com pistilo plástico descartável usando-se homogeneizador elétrico, em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo o tampão de extração de cada método.

Métodos de Extração de DNA. Foram comparados quatro métodos de extração de DNA conforme abaixo descritos:

Método Doyle & Doyle – modificado. Trata-se de um protocolo similar ao descrito por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações. Resumidamente, as cabeças foram trituradas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 300 µl do tampão de extração [100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2% CTAB, 1,4 M NaCl e 20 mM EDTA]. Após 30 min. de incubação a 65°C, o material foi centrifugado por 10 min. (10000 g) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização e centrifugação, a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado 250 µl de isopropanol gelado, seguido de nova centrifugação para a precipitação do DNA. O DNA foi lavado com 1,0 ml de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 50 µl de tampão TE { 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA } e armazenado a -20°C.

Método Cheung – modificado. Foi utilizado um protocolo similar ao descrito por Cheung *et al.* (1993), com pequenas modificações. As cabeças foram trituradas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 200 µl do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0) 2 M NaCl e 70 mM EDTA]. Em seguida, adicionaram-se 50 µl de sarcosyl 5% e a solução foi homogeneizada novamente. Após 30 min. de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 15 min. (10000 g) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 110 µl de acetato de amônia 10 M e 250 µl de isopropanol gelado. Após centrifugação, o precipitado foi lavado duas vezes com 300 µl de etanol 70% gelado e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 50 µl de tampão TE { 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA } com RNase (10 µg/ml) e armazenado a -20°C.

Método Walsh. Este protocolo foi descrito por Walsh *et al.* (1991). As cabeças dos insetos foram trituradas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 700 µl de solução de Chelex 5% (Bio-Rad) e incubadas inicialmente a 56°C durante 30 min. e posteriormente a 100°C durante 5 min. Em seguida o material foi centrifugado durante 30 s (10000 g) e armazenado a -20°C.

Método Yu – modificado. Trata-se de um protocolo similar ao descrito por Yu *et al.* (1993). As cabeças foram homogeneizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 300 µl do tampão de extração [200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% SDS, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA e 100 µg/ml Proteinase K]. Após 30 min. de incubação a 65°C, o material foi centrifugado durante 10 min. (10000 g) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização e centrifugação para separação das fases, a fase superior foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado através da adição de 250 µl de isopropanol gelado, seguido de nova centrifugação durante 15 min. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1,0 ml de etanol 70% gelado e deixado secar à

temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 50 μ l de tampão TE {10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA} e armazenado a -20°C.

A quantidade de DNA obtida em cada amostra nos diferentes métodos de extração foi determinada por fluorimetria (DyNA Quant 200, Hoefer Instruments), com o corante Hoechst 33258.

A qualidade do DNA foi determinada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A corrida foi realizada em 0,5X TBE (Tris-borato-EDTA) a 5 V/cm, corando-se o gel em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/ml. O gel foi fotografado sob luz UV com filme Polaroid. As fotos foram analisadas usando-se densitômetro (Bio-Rad, mod. 620) e, após o ajuste para a fluorescência do gel, a integral da varredura foi calculada para três intervalos de peso molecular: $\geq 9,4$ kb, $< 9,4$ kb $> 2,3$ kb e $\leq 2,3$ kb.

Para verificar o efeito do método de extração na reproducibilidade do perfil de bandas, o DNA extraído por meio dos melhores métodos foi utilizado em PCR-RAPD com o primer OPA-03 (Operon Tech.). As reações foram conduzidas em um volume de 25 μ l, contendo 40 ng de DNA, 100 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de primer, 2 mM $MgCl_2$ e 1,0 U de *Taq* polimerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl. As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.), programado para um ciclo de 2 min. a 94°C, 1 min. a 36°C e 2 min. a 72°C, seguido de 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 36°C e 2 min. a 72°C, com extensão final de 5 min. a 72°C. Os produtos das amplificações do DNA foram analisados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio a 0,5 μ g/ml e fotografado sob luz UV com filme Polaroid. Os dois melhores métodos de extração foram selecionados para os experimentos de determinação dos fatores de maior significância para a eficiência da reação de PCR-RAPD.

Determinação de Fatores com Maior Influência em PCR-RAPD. Para se determinar quais os fatores com maior influência na reação de PCR-RAPD utilizou-se o Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) (Tabela 1), de acordo com Boleda *et al.* (1996), avaliando-se as seguintes variáveis em dois níveis: 1) método de extração de DNA [Cheung e Yu]; 2) quantidade de DNA [25 ng e 50 ng]; 3) concentração de $MgCl_2$ [1,5 e 3,0 mM]; 4) concentração de albumina de soro bovino (BSA) [0,05 e 0,1%]; e 5)

programas de amplificação [P₁: 2 min. a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 36°C e 2 min. a 72°C, com extensão final de 5 min. a 72°C; P₂: 3 min. a 94°C, 3 min. a 35°C, 2 min. a 72°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 36°C e 2 min. a 72°C, com extensão final de 5 min. a 72°C.

Nas reações de PCR-RAPD foram utilizados 25 μ l de solução, contendo 100 μ M de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,2 μ M de primer, 1,0 U de *Taq* polimerase. Foram utilizados os primers OPW-02, OPT-11, OPA-02, OPC-18, OPA-04 e OPB-07 (Operon Tech.). Os demais fatores da reação variaram conforme acima especificado. Os produtos das reações foram observados em gel de agarose a 1,5%, corado em brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e fotografado com filme Polaroid. A intensidade das bandas claramente visíveis e reproduzíveis foi avaliada através de nota visual cuja escala variou de 0 a 5, sendo que o total acumulado das notas de cada experimento, obtido com cada um dos primers, foi utilizado para as análises estatísticas realizadas através do programa Statgraphics 5.0 (Graphic Software System).

Otimização dos Fatores com Maior Influência em PCR-RAPD. Para otimização dos dois fatores de maior impacto nas reações de PCR-RAPD, utilizou-se o Delineamento Central Composto (DCC), de acordo com Boleda *et al.* (1996), conforme matriz apresentada na Tabela 2. Nas reações de PCR-RAPD foram utilizados 25 μ l de solução, contendo 100 μ M de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl 0,2 μ M do primer OPA-04 (Operon Tech.), BSA 0,05% e 1,0 U de *Taq* polimerase. Os produtos das reações foram observados em gel de agarose a 1,5%, corado em brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e fotografado com filme Polaroid. A intensidade das bandas foi determinada através de densitometria, sendo a somatória dos valores da reflectância de todas as bandas de cada experimento multiplicada por 10⁻¹ e utilizada para as análises estatísticas realizadas através do programa Statgraphics 5.0.

Resultados e Discussão

Extração de DNA. As maiores quantidades de DNA foram obtidas pelos métodos Cheung, Walsh e Yu, que não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do método Doyle &

Tabela 1. Matriz do Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) 2⁽⁵⁻²⁾.

Experimento	Fator				
	Método de extração	DNA (ng)	$MgCl_2$ (mM)	BSA (%)	Programa
1	Cheung	25	1,5	0,1	P ₁
2	Cheung	25	3,0	0,05	P ₂
3	Cheung	50	1,5	0,05	P ₂
4	Chung	50	3,0	0,1	P ₁
5	Yu	25	1,5	0,05	P ₁
6	Yu	25	3,0	0,1	P ₂
7	Yu	50	1,5	0,1	P ₂
8	Yu	50	3,0	0,05	P ₁

Tabela 2. Matriz do Delineamento Central Composto (DCC).

Experimento	Fator			
	Código dos níveis		Nível real	
	DNA	MgCl ₂	DNA (ng)	MgCl ₂ (mM)
1	- 1	- 1	15	2
2	+ 1	- 1	35	2
3	- 1	+ 1	15	4
4	+ 1	+ 1	35	4
5	- 1,41	0	11	3
6	+ 1,41	0	39	3
7	0	- 1,41	25	1,6
8	0	+ 1,41	25	4,4
9	0	0	25	3
10	0	0	25	3
11	0	0	25	3
12	0	0	25	3

Doyle, que apresentou a extração de menores quantidades de DNA (Tabela 3).

Embora existam variações nas concentrações dos componentes do tampão de extração, a diferença básica entre os métodos Doyle & Doyle, Cheung e Yu é quanto ao detergente utilizado para a lise celular e precipitação de proteínas. Enquanto nos métodos Cheung e Yu utiliza-se, respectivamente, sarcosyl e SDS, pelo método Doyle & Doyle utiliza-se o detergente catiônico CTAB. A extração de menores quantidades de DNA através do método Doyle & Doyle, provavelmente foi devida à concentração de CTAB utilizada no tampão, que pode ter sido inadequada para a extração de DNA de cabeças de *Atta*. Waldschmidt *et al.*

(1997), extraíndo DNA de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae), observaram que quando a concentração de CTAB foi reduzida de 2% para 1%, mantendo-se constante os demais componentes do tampão de extração, o método tornou-se ineficiente. O método Walsh, apesar de não utilizar nenhum agente desnaturante, extraiu quantidades de DNA semelhantes aos métodos Cheung e Yu. Este método utiliza apenas uma solução a 5% da resina de troca catiônica Chelex, sendo que a ruptura dos tecidos ocorre devido à fervura do material.

Apesar de todos os métodos possibilitarem a extração de DNA suficiente para preparar cerca de 60 a 140 reações de PCR-RAPD, tanto o DNA obtido por meio do método Doyle

Tabela 3. Quantidade de DNA (mg) extraído/cabeça de operária máxima de *A. sexdens rubropilosa*, por meio de diferentes métodos.

Amostra	Método de extração			
	Doyle & Doyle	Cheung	Walsh	Yu
1	1,00	5,80	2,80	3,50
2	2,55	1,95	4,00	2,25
3	1,50	4,40	3,05	3,15
4	1,10	1,10	2,15	3,90
5	1,55	1,90	2,85	2,00
6	1,85	6,50	3,70	3,75
7	2,00	3,55	3,20	2,70
8	0,85	3,35	3,15	5,00
9	1,50	1,90	3,45	3,10
10	1,10	4,35	4,45	3,25
Média	1,50 ^b	3,48 ^a	3,28 ^a	3,26 ^a

Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

& Doyle como do método Walsh apresentaram-se totalmente degradados (Fig. 1). Embora neste trabalho o DNA extraído pelo método Doyle & Doyle se encontrasse degradado, o método tem sido amplamente empregado com sucesso por diversos autores para a extração de DNA de espécimes de Lepidoptera (Roehrdanz 1997, Deverno, *et al.* 1998), Hymenoptera (Waldschmidt, *et al.* 1997) e Diptera (Stevens & Wall 1997). Em comparação com os métodos Cheung e

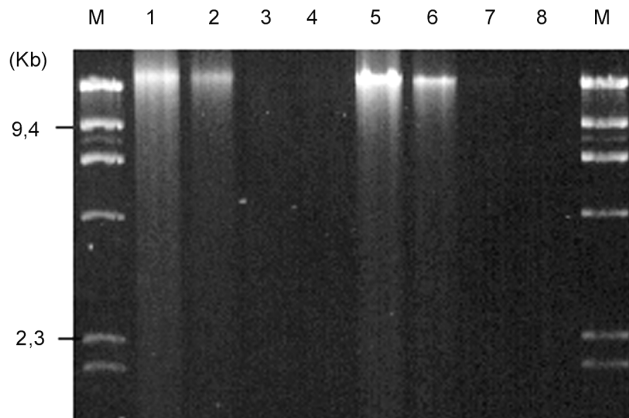


Figura 1. Integridade do DNA de *A. sexdens rubropilosa* extraído por meio de diferentes métodos. (M) marcador 1/ *HindIII*; (1-2) método Yu; (3-4) método Doyle & Doyle; (5-6) método Cheung; (7-8) método Walsh.

Yu, a concentração de EDTA no tampão de extração utilizado neste método é baixa (20 mM). Como esse componente é incluído no tampão com o objetivo de inibir DNAses (Ferreira & Grattapaglia 1996), a concentração empregada pode ter sido insuficiente para evitar a degradação do DNA. Da mesma forma, a degradação do DNA extraído pelo método Walsh, provavelmente deve-se à baixa concentração utilizada de Chelex. Apesar da alta atividade quelante de íons de metais polivalentes dessa resina, a concentração utilizada pode não

ter sido suficiente para inibir a ação das nucleases devido à grande quantidade de material utilizado no processo de extração (cabeça de operária maior). DNA com qualidade para análises de PCR tem sido obtido somente de insetos de tamanho pequeno das ordens Hemiptera (Honda *et al.* 1998) e Hymenoptera (Edwards & Hoy 1993, Vanlerberghe-Masutti 1994), assim como também de outras pequenas amostras tais como fungos, leveduras (Bernal *et al.* 1997), sêmen, sangue e cabelo (Walsh *et al.* 1991).

A qualidade do DNA extraído por meio dos métodos de 2 e 4 pode ser observada através dos dados apresentados na Tabela 4. Observa-se que a porcentagem de DNA com peso molecular $\geq 9,4$ kb extraída pelo método Cheung (70,59%) diferiu significativamente da extraída pelo método Yu (59,67%). A reproducibilidade do PCR-RAPD utilizando DNA extraído por meio desses protocolos (Fig. 2) demonstrou que o padrão de bandas, considerando apenas as claramente visíveis e reproduzíveis, não foi afetado pelo

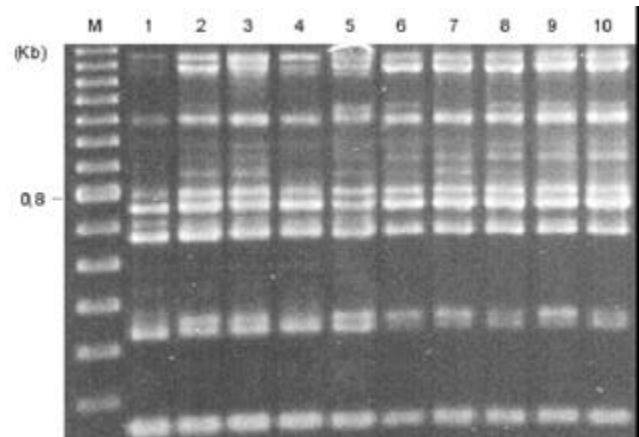


Figura 2. Reproducibilidade do padrão de bandas de PCR-RAPD obtido com DNA extraído de diferentes espécimes de *A. sexdens rubropilosa*, por meio de diferentes métodos e amplificado com o primer OPB-03. (M) marcador 100 pb; (1-5) método Cheung; (6-10) método Yu.

Tabela 4. Influência do método de extração sobre a qualidade do DNA extraído de cabeças de operária maior de *A. sexdens rubropilosa*.

Método de extração	Porcentagem de DNA		
	$\geq 9,4$ kb	$< 9,4$ kb $> 2,3$ kb	$\leq 2,3$ kb
Cheung	1,00 b ¹ (70,60) ²	0,51 b (24,20)	0,22 b (5,20)
Yu	0,88a (59,67)	0,55 b (27,43)	0,36a (12,90)

¹Dados transformados em arcoseno $\text{Öx}/100$. Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

² Dados originais em porcentagem de DNA.

método de extração. Estes resultados demonstram que ambos os métodos são adequados para a extração de DNA para análises de PCR-RAPD. Entretanto, o custo das extrações quando se utiliza o método Cheung é inferior ao custo com o método Yu.

Fatores com Maior Influência em PCR-RAPD. O fator método de extração teve pouco efeito sobre o PCR-RAPD, diferindo dos demais fatores. Apesar da pequena importância do método de extração sobre a amplificação de fragmentos de DNA, o método Chung foi superior ao método Yu, provavelmente devido à maior quantidade de DNA de peso molecular acima de 9,4 kb extraída por este protocolo (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito dos diferentes fatores sobre o padrão de bandas obtidos em PCR-RAPD com DNA extraído da cabeça de *A. sexdens rubropilosa* e amplificado com seis primers.

Fator	Nível do fator com > efeito	Efeito ¹
Método de Extração de DNA	Cheung	0,825
Quantidade de DNA	25 ng	1,975
Concentração de MgCl ₂	3,0 mM	1,225
Concentração de BSA	0,01%	1,475
Programa de amplificação	P ₂	3,075

¹Influência do fator sobre a reproducibilidade do PCR-RAPD. Quanto maior o valor absoluto, maior o benefício do fator sobre PCR-RAPD.

O programa de temperatura foi o que mais influenciou a qualidade do padrão de bandas, sendo que o programa P₂ propiciou os melhores resultados. A maior diferença entre os programas P₁ e P₂ encontra-se no aumento dos períodos de desnaturação, anelamento e extensão no primeiro passo do programa P₂, antes de se iniciarem os 40 ciclos de amplificação.

Observa-se também que, com o aumento da concentração de MgCl₂ de 1,5 para 3,0 mM e com a diminuição da concentração de BSA de 0,1% para 0,05% e da concentração de DNA de 2 ng/μl para 1 ng/ml, ocorreu um aumento significativo no número de fragmentos de DNA amplificados. Em ambos os programas de temperatura, o número de fragmentos de DNA amplificados foi maior quando se utilizou 3 mM de MgCl₂, sendo esse efeito observado com maior evidência no programa P₂. Embora a concentração de MgCl₂ seja muito importante para obtenção de um padrão de bandas reproduzível, sua importância foi menor do que a concentração de DNA na amplitude utilizada neste trabalho (Tabela 5).

A adequação da concentração de DNA é muito importante, uma vez que seu excesso pode resultar ou na falha completa da reação devido à alta concentração de impurezas agregadas, ou a perfis eletroforéticos com arraste

e bandas pouco definidas. Por outro lado, baixa concentração do DNA resulta em amplificação errática ou não amplificação de certos fragmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (Ferreira & Grattapaglia 1996).

Entre as concentrações de DNA avaliadas, a de 1 ng/ml foi melhor do que a de 2 ng/ml. Outro fator de relativa importância na reação de PCR-RAPD foi a adição de BSA. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1996), o BSA é utilizado como estabilizador de atividades enzimáticas contra a desnaturação durante o armazenamento, diluições ou reações *in vitro*. A adição de BSA resulta em amplificações com bandas mais intensas, em maior homogeneidade entre as amostras e principalmente na eliminação de reações falhas. Os melhores resultados foram obtidos com BSA a 0,05%. Quando se utilizou BSA a 0,1%, ocorreu a formação de “grumos” de aspecto gelatinoso no interior da reação, comprometendo sua qualidade. Resultados negativos também foram obtidos por Liu & Berry (1995) quando utilizaram a concentração de 0,18% de BSA na reação de amplificação de DNA de diferentes espécies de nematóides.

Os resultados aqui alcançados indicam que maior eficiência de amplificação dos fragmentos de DNA *em Atta* é obtida quando nas reações PCR-RAPD são utilizados os seguintes fatores: método de extração Cheung, programa de amplificação P₂, BSA 0,05%, 3,0 mM MgCl₂ e 1 ng/μl de DNA. Desses fatores, a concentração de MgCl₂ e a quantidade de DNA foram selecionados para serem otimizados, devido à sua reconhecida importância nas amplificações de PCR-RAPD.

Otimização da Concentração de MgCl₂ e Quantidade de DNA. A superfície de resposta, que descreve o comportamento do sistema dentro dos parâmetros estudados, produto da equação PCR = 12,34 + (0,34 A) + (-1,30 B) + (-2,53 A²) + (-1,78 B²) + (1,7A B), onde A = quantidade de DNA e B = concentração de MgCl₂, permitiu localizar a região ótima a qual possibilita a melhor eficiência de amplificação dos fragmentos do DNA, avaliada através da intensidade das bandas medida por densitometria. (Fig. 3). Nela observa-se que a concentração de MgCl₂ deve estar entre 2,0 e 3,2 mM e a quantidade ótima de DNA entre 19 e 30 ng em uma reação de 25 μl. Resultados similares foram reportados por Liu & Berry (1995) que concluíram ser de 3,5 mM de MgCl₂ a concentração ótima para PCR-RAPD com DNA de duas espécies de nematóides entomopatogênicos.

Considerando que a eficiência da atividade da *Taq* polimerase e o anelamento dos primers dependem da concentração de MgCl₂, a sua amplitude de variação deve ser muito estreita, uma vez que concentrações incorretas podem resultar em baixa eficiência de amplificação ou na produção de produtos não específicos. Devido à sua importância para a reação de PCR-RAPD, o MgCl₂ deveria ser otimizado para cada combinação espécie e primer, separadamente (Wolff *et al.* 1993). Na prática, a otimização do MgCl₂ para cada primer nem sempre é viável quando um número de primers diferentes é utilizado com um número grande de diferentes amostras. O intervalo ótimo de concentração de MgCl₂ entre 2,0 e 3,2 mM, encontrado neste

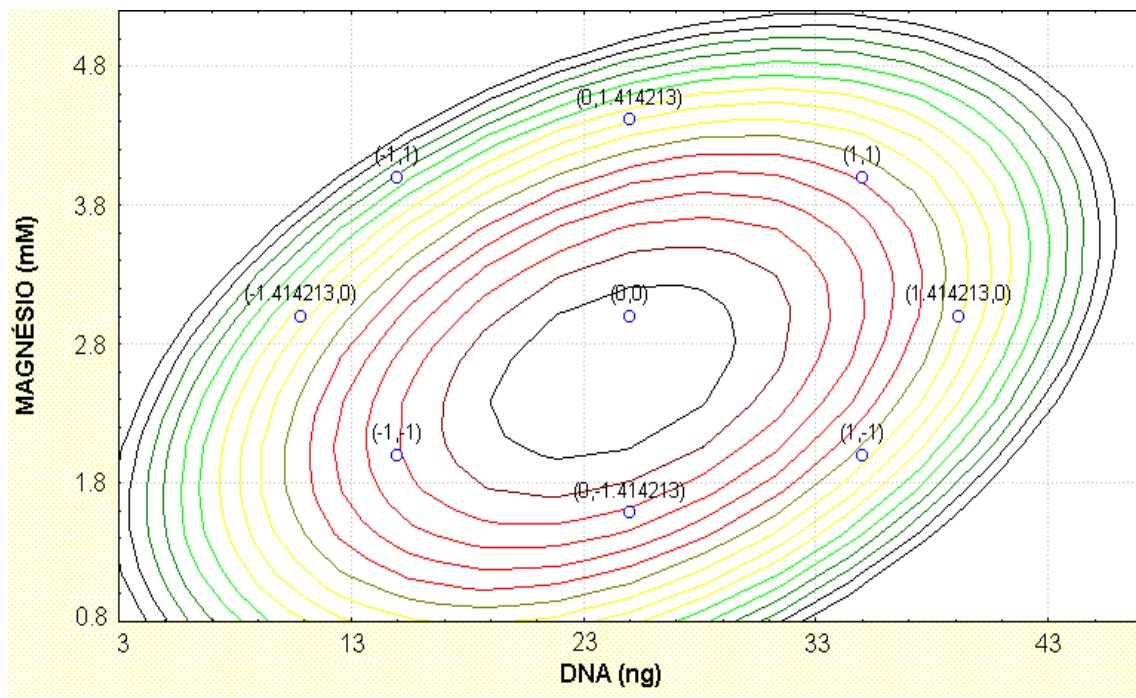


Figura 3. Superfície de resposta do padrão de PCR-RAPD em função das concentrações de $MgCl_2$ e quantidade de DNA. As condições ótimas para PCR-RAPD encontram-se na área central da figura.

trabalho, está dentro do intervalo de 1,5 e 4,0 mM utilizado pela maioria dos autores.

A quantidade de DNA 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. Consequentemente, para reprodutibilidade da reação de PCR-RAPD, a quantidade de DNA deverá ser definida e permanecer constante (Jutras *et al.* 1995). Embora seja conhecido que em vegetais a quantidade ótima de DNA varia grandemente de espécie para espécie: de 3 ng em *Brassica* sp. (Demeke *et al.* 1991) até 400 ng em tomate (Klein-Lankhorst *et al.* 1991), nas espécies de insetos as quantidades de DNA utilizadas nas reações têm oscilado entre 10 e 50 ng (Vanlerberghe-Masutti 1994, Stevens & Wall 1997, Margaritopoulos *et al.* 1998, Edwards & Hoy 1993). Os resultados aqui obtidos indicam que a quantidade ótima de DNA de *A. sexdens rubropilosa* para as reações de PCR-RAPD está entre 19 e 30 ng, o que é compatível com as quantidades normalmente utilizadas para outros insetos.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece ao Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR pelo suporte financeiro à realização deste trabalho e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos durante o primeiro ano de realização do curso de doutorado. Este trabalho é parte da tese de doutorado do primeiro autor, em Entomologia, apresentada à Universidade Federal do Paraná.

Literatura Citada

- Bernal, M., M.L. Baquero-Mezence, F. Provost, F. Laurent, G. Martinez-Machin & P. Boiron. 1997. A one-step *Candida albicans* DNA extraction method using "Chelex® 100 Resin" suitable for DNA amplification (PCR). *J. Mycol. Med.* 7: 53-54.
- Boleda, M.D., P. Briones, J. Ferrés, L. Tyfield & R. Pi. 1996. Experimental design: A useful tool for PCR optimization. *BioTechniques* 21: 134-140.
- Cheung, W.Y., N. Hubert & B.S. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction for plant, insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *PCR Meth. Applic.* 3: 69-70.
- Demeke, T., R.P. Admas & R. Chibbar. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): A case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 990-994.
- Deverno, L.L., G.A. Smith & K.J. Harrison. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA evidence of introgression in two closely related sympatric species of coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae) in Atlantic Canada. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91: 248-259.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

- Edwards, O.R. & M.A. Hoy. 1993.** Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Biol. Control* 3: 243-257.
- Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1996.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. (EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20).
- Hardrys, H., M. Balick & B. Schierwater. 1992.** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55-66.
- He, Q., M.K. Viljanen & J. Mertsola. 1994.** Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Mol. Cell. Probe.* 8: 155-160.
- Honda, J.Y., Y. Nakashima, T. Yanase, T. Kawarabata & Y. Hirose. 1998.** Use of internal transcribed spacers (ITS-1) region to infer *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) species phylogeny. *Appl. Entomol. Zool.* 33: 567-571.
- Jutras, E.M., R.M. Miller & I.L. Pepper. 1995.** Optimization of arbitrarily primed PCR for the identification of bacterial isolates. *J. Microbiol. Meth.* 24: 55-63.
- Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermut, R. Weide, R. Liharska & P. Zabel. 1991.** Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83: 108-114.
- Levi, A., L.J. Rowland & J.S. Hartung. 1993.** Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of wood plants. *HortScience* 28: 1188-1190.
- Liu, J. & R.E. Berry. 1995.** Determination of PCR conditions for RAPD analysis in entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 65: 79-81.
- Margaritopoulos, J.T., Z. Mamuris & J.A. Tsitsipis. 1998.** Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91: 602-607.
- Meunier, J.R. & P.A.D. Grimont. 1993.** Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373-379.
- Roehrdanz, R.L. 1997.** Identification of tobacco budworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) during early developmental stages by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90: 329-332.
- Staub, J., J. Bacher & K. Poetter. 1996.** Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNA in cucumber. *HortScience* 31: 262-266.
- Stevens, J. & R. Wall. 1997.** Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. *Biochem. Syst. Ecol.* 25: 81-97.
- Vanlerberghe-Masutti, F. 1994.** Detection of genetic variability in *Trichogramma* populations using molecular markers. *Norwegian J. Agric. Sci., Suppl.* 16: 171-176.
- Waldschmidt, A.M., T.M.F. Salomão, E.G. Barros & L.A.O. Campos. 1997.** Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.* 20: 421-423.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger & R. Higuchi. 1991.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513.
- Williams, J.G.K., A.R. Kublik, K.L. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18: 6531-6535.
- Wolff, K., E.D. Schoen & J. Peters-Van Rijn. 1993.** Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theor. Appl. Genet.* 86: 1033-1037.
- Yu, K.F., A. van Deynze & K.P. Paulus. 1993.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, p. 287-301. In BR Glick (ed.), *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, USA.

Received 02/02/01. Accepted 15/11/01.