



Nota Científica

DNA total do solo: efeitos do armazenamento e conservação das amostras

Ana Carla Stieven^{1*}; Dafne Alves Oliveira²; Eduardo Guimarães Couto³; Daniela Tiago da Silva Campos³

Submetido 13/03/2015 – Aceito 12/08/2015 – Publicado on-line 25/08/2015

Resumo

O armazenamento de amostras de solo, que posteriormente serão utilizadas para as técnicas de biologia molecular, é de fundamental importância, uma vez que essa fase ainda é um obstáculo para o sucesso nas etapas que se sucedem. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo de armazenamento das amostras na extração e quantificação do DNA total de amostras de solo armazenadas sob congelamento. Os solos foram coletados na profundidade de 0-10 cm em áreas sob o sistema de integração Lavoura-Pecuária-Floresta, rotação soja/pastagem e mata nativa. As coletas foram feitas em outubro de 2009, março de 2010, outubro de 2010 e março de 2012. As amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados, mantidas sob refrigeração durante o período de coleta e transporte até o laboratório, onde foram congeladas em freezer (-20°C ±2) até o momento da extração do DNA. O DNA total foi extraído com o kit Power Soil (Mo Bio®) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 1,5 % e corado com brometo de etídio. Os resultados encontrados demonstram que há uma relação direta entre o maior tempo de congelamento das amostras com a menor eficiência na extração do DNA. Sugere-se que sejam testados outros métodos de extração, uma vez que diferentes métodos atuam em diferentes aspectos na extração do DNA. Conclui-se que o congelamento das amostras de solo gera danos a célula microbiana, o que dificulta a extração do DNA total das mesmas.

Palavras-Chave: amostras de solo, degradação do material genético, extração de DNA.

Abstract

The soil samples storage, which will later be molecular biology techniques used, there is fundamental importance, since this phase is still an obstacle to success in the steps that follow. The objective of this study was to evaluate the storage time samples influence on the total DNA extraction and quantification from soil samples stored under freezing. Soil samples were collected at 0-10 cm depth in areas under the integration Crop-Livestock-Forest system, soybean/pasture rotation and native forest. The samples were taken in October 2009, March 2010, October 2010 and March 2012. The soil samples were placed in pre-labeled plastic bags, kept under refrigeration during the collection and transport to the laboratory where they were frozen in freezer (-20 ° C ± 2) until the DNA extraction. Total DNA was extracted with Power Soil Kit (Mo Bio®) according to the manufacturer's recommendations. After extraction, the DNA was quantified by 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. The results show that there is a direct relationship between the longer samples freezing with less efficient DNA extraction. It is concluded the soil samples freezing generates damage microbial cell, which complicates the total DNA extraction from them. It is suggested that to be tested other extraction methods, since the different methods are used in different constraints on DNA extraction.

Keywords: soil samples, genetic material degradation, DNA extraction.

¹ Doutoranda do programa de pós-graduação em Agricultura Tropical, Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Cuiabá, Avenida Fernando Correa da Costa, n° 2367, Bairro Boa Esperança, CEP: 78060-900, Cuiabá-MT, Brasil; e-mail: anastieven@yahoo.com.br

² Doutoranda do programa de pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade Estadual do Mississippi, Estados Unidos; e-mail: dafnealves.oli@gmail.com

³³ Docentes do programa de pós-graduação em Agricultura Tropical, Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Cuiabá, MT; e-mail: egcouth@gmail.com; camposdts@yahoo.com.br

Nota Científica

1. Introdução

A biologia molecular evoluiu muito a partir da descrição do material genético, proposto por WATSON e CRICK (1953). Após esse período, a evolução ocorreu de tal forma que a engenharia genética possibilitou a amplificação de sequências individuais de DNA, com a reação em cadeia de polimerase (PCR), que foi desenvolvida por MULLIS e FALOONA (1987) (JOAQUIM e EL-HANI, 2010). Outra aplicabilidade das análises moleculares é a classificação de micro-organismos, seja em aspectos clínicos, fitopatológicos ou biotecnológicos. Dentro da classificação, a aplicação mais utilizada é a discriminação de gêneros, espécies ou estirpes de micro-organismos, onde os métodos moleculares apresentam-se mais vantajosos em comparação aos métodos fenotípicos ou bioquímicos (QUINTAES et al., 2004; SARTORETTO e FARIAS, 2010).

Em ambientes com diversidade de micro-organismos, como o habitat solo, onde estimativas apontam que em apenas um grama de solo existem de 2000 a 8,5 milhões de bactérias (GANS et al., 2005), sendo que uma parcela significativa corresponde a bactérias não cultivadas, as técnicas moleculares tornam-se importantes ferramentas. As técnicas clássicas aplicadas para a identificação e quantificação dessas comunidades, por meio de meios seletivos e contagem direta, não supre a demanda de identificação, sendo assim, frente à parcela não cultivada, torna-se necessária à aplicação de novas técnicas (TORVIKS et al., 2002; SARTORETTO e FARIAS, 2010).

Entretanto, as técnicas moleculares apresentam a necessidade de quantidade favorável, bem como purificação do material genético dos organismos em questão. São inúmeras as metodologias para extração de DNA, no entanto independentemente do método utilizado, a finalidade dos protocolos de extração é resultar em um DNA de alta qualidade e em quantidade, e métodos rápidos e eficientes (GERHARDT, 1994; SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Porém, antes do processo de extração do material genético as amostras são, geralmente, congeladas a -20 °C (GLICK e PASTERNAK, 1994; SAMBROOK e RUSSEL, 2001; SARTORETTO e FARIAS, 2010),

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o tempo de armazenamento de amostras de solo interfere na quantidade e qualidade do DNA total extraído de amostras de solo submetidas a congelamento por diferentes períodos de tempo.

2. Material e Método

O trabalho foi desenvolvido com amostras de solos coletados na região Norte do estado de Mato Grosso, município de Nova Canaã do Norte, em uma Unidade de Referência Tecnológica (URT) da Embrapa Arroz e Feijão. A URT está localizada na fazenda Gamada e é composta por um sistema de integração Lavoura-Pecuária-Floresta estabelecido em dezembro de 2008. Os sistemas avaliados são apresentados abaixo.

As amostras de solo foram coletadas em outubro de 2009, março de 2010, outubro de 2010 e março de 2012, na profundidade de 0-10 cm e mantidas sob refrigeração durante o período de coleta e transporte até o laboratório, onde foram congeladas em freezer (-20 °C ±2) até o momento da extração do DNA total. O solo foi amostrado em quatro pontos diferentes em cada sistema (Tabela 1), e dentro deles, três subamostras foram coletadas para compor uma amostra composta de cada ponto.

A extração do DNA total da comunidade microbiana do solo foi realizada a partir de uma amostra composta de todas as subamostras do solo de cada sistema. Esta amostra composta foi homogeneizada por 5 minutos antes do congelamento.

As extrações foram realizadas em maio de 2012 utilizando-se o kit Power Soil (Mo Bio®) seguindo as recomendações do fabricante, onde se utilizou 0,25 g de solo congelado.

Para a quantificação e avaliação visual da qualidade do DNA extraído utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio (10 mg.mL⁻¹).

3. Resultados e Discussão

O tempo de armazenamento influenciou diretamente na quantidade e qualidade de DNA total de solo, como mostra a Figura 1.

Os sistemas identificados de 1 a 5 são os visivelmente afetados pelo tempo de congelamento, uma vez que estes permaneceram por maior tempo, aproximadamente 2,5 anos sob

Nota Científica

congelamento. É possível observar que as amostras apresentam menor quantidade de DNA extraído, onde apenas as amostras 2 e 5

apresentaram identificação da presença de resultado de extração, mas em quantidades muito reduzidas quando comparadas as demais.

Tabela 1 - Descrição dos sistemas dispostos na URT e utilizados para coleta de amostras com as respectivas identificações para a apresentação dos resultados.

ID	Sistema	Configuração
1, 6, 11, 16	iLPF linha simples de eucalipto	Faixa de 200 m de largura com povoamento de eucalipto (<i>Eucalyptus urograndis</i>), em linhas únicas de 250 m de comprimento separadas entre si por 20 m, com plantio <i>Brachiaria ruziziensis</i> nas entrelinhas.
2, 7, 12, 17	iLPF linha dupla de eucalipto	Faixa de 200m de largura com povoamento de eucalipto (<i>E. urograndis</i>) distribuídos em sub-faixas compostas por duas linhas de 250 m de comprimento separadas entre si por 3 m, com distância entre plantas de 2 m e distância entre sub-faixas de 20 m, com plantio <i>Brachiaria ruziziensis</i> nas entrelinhas.
3, 8, 13, 18	iLPF linha tripla de eucalipto	Faixa de 200 m de largura com povoamento de eucalipto (<i>E. urograndis</i>) distribuídos em sub-faixas composta por três linhas de 250 m de comprimento separadas entre si por 3 m, com distância entre plantas de 2 m e distância entre sub-faixas de 20 m, com plantio <i>Brachiaria ruziziensis</i> nas entrelinhas.
4, 9, 14, 19	Rotação soja/pastagem	Área anteriormente com plantio de soja (<i>Glycine max</i>) na safra, milho (<i>Zea mays</i>) na safrinha e atualmente <i>Brachiaria ruziziensis</i> .
5, 10, 15, 20	Mata nativa	Área com mata nativa característica da região.

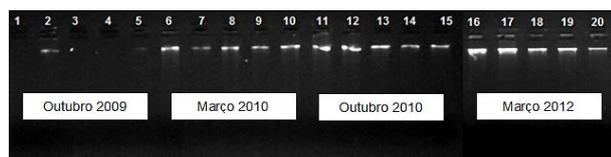


Figura 1 - DNA total de amostras de solo em um sistema de integração Lavoura-Pecuária-Floresta, rotação soja/pastagem e mata nativa, provenientes de quatro coletas armazenadas sob congelamento por diferentes períodos de tempo.

Esse resultado indica que a quantidade e qualidade de DNA extraído não são adequadas para a realização das demais técnicas de biologia molecular. O resultado encontrado corrobora com vários autores que apontam que há interferência da qualidade do DNA na amplificação por PCR, devendo ser descartadas as amostras que não apresentem, no teste preliminar de gel de agarose, visível quantidade e qualidade de material a ser amplificado (GLICK e PASTERNAK, 1994; SAMBROOK e RUSSEL, 2001; SARTORETTO e FARIAS, 2010).

Os sistemas identificados com os números de 6 a 15 foram melhor extraídas quando comparadas as primeiras amostras, porém há sinais de degradação do DNA, identificados pelos “riscos brancos” que aparecem abaixo das identificações de extração. Além dos sinais de degradação, observa-se baixo resultado da concentração da extração de DNA quando

comparamos essas com as amostras com menos tempo de congelamento, março de 2012.

Entretanto, além dos danos de congelamento é possível encontrar na literatura justificativas da baixa qualidade do DNA, o que leva a degradação, a presença de contaminantes orgânicos no extrato de DNA (NOGUEIRA et al, 2004), o que pode justificar e ter potencializado a degradação nas amostras de 6 a 15, que apresentaram DNA de baixa qualidade.

As amostras mais recentes, ou seja, que permaneceram por um tempo menor de congelamento, identificadas de 16 a 20, estão nítidas, com maior quantidade de amostra de DNA, bem como com resultados de extração melhor definidas.

Foi possível observar que os resultados não corroboram com a literatura, quando esta aponta o método de congelamento a -20 °C como vantajoso, que o produto pode ser armazenado por um longo tempo, preservando os aspectos essenciais (TIERNEY, 2003; MAHMOUDI et al., 2011; BREWER et al., 2015).

Entretanto, como sugestão, testar outros métodos de extração seja uma alternativa frente à problemática verificada, uma vez que diferentes métodos atuam em diferentes aspectos da extração do DNA.



Nota Científica

4. Conclusão

Este trabalho mostrou que o congelamento gera danos às amostras, o que dificulta a extração do DNA total das mesmas, por meio do kit Power Soil (Mo Bio®).

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Agrisus pelo financiamento deste projeto (Processo PA 690/2010).

Divulgação

Esta nota inédita e os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, desta nota (resumo), por meio eletrônico.

Referências

- BREWER, S., TECHTMANN, S. M., MAHMOUDI, N., NIANG, D., PFIFFNER, S., HAZEN, T. C. Co-extraction of DNA and PLFA from soil samples. **Journal of Microbiological Methods**. 115, 64-66. 2015.
- GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**. 309:387-1390, 2005.
- GERHARD, P. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Massachusetts: American Society for Microbiology, USA, 1994. 791 p.
- GLICK, B.R.; PARSTERNAK, J.,J. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. Channarayappa, Universities Press. 1994. 1217p.
- JOAQUIM, L.M.; EL-HANI, C.N. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientia e Studia**. 8(1):93-128, 2010.
- MAHMOUDI, N., SLATER, G.F., FULTHORPE, R.R. Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. **Canadian Journal of Microbiology**. 57:623-628, 2011.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**. 155:335-350, 1987.
- NOGUEIRA, C.A.M.; MOMESSO, C.A.S.; MACHADO, R.L.D.; ALMEIDA, M.T.G. DE.; ROSSIT, A.R.B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**. 6:35-38, 2004.
- QUINTAES, B.R.; LEAL, N.C.; REIS, E.M.F.; HOFER, E. Optimization of Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction for Molecular Typing of Salmonella enterica serovar Typhi. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 37:143-147, 2004.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a Laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001. 800p.
- SARTORETTO, L.M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. **Unoesc E Ciência – ACET** 2:155-162, 2010.
- TIERNEY, A. **DNA in Crime Solving**. In: BORÉN, A.; SANTOS, F.R.; ALMEIDA, M.R. Biotecnologia de A à Z. Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. 2003. 229 p.
- TORSVIK, V., OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current opinion in Microbiology**. 5: 240-245, 2002.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H.C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature** 171:737-738, 1953.