



## ESTABELECIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA EM TECIDO FOLIAR DE *Curcuma longa*. (L)<sup>6</sup>

Kátia Fabiane Medeiros Schmitt<sup>1,6</sup>, Bruna Mezzalira da Silva<sup>2,6</sup>, Ana Aparecida Bandini Rossi<sup>3,6</sup>, Nilo Sander<sup>4,6</sup>, Carolina Joana da Silva<sup>5,6</sup>

1. Graduanda do Curso de Ciências Biológicas do campus Universitário de Alta Floresta, MT – UNEMAT, Alta Floresta, Brasil. Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular. E-mail: [kmedeiroschmitt@gmail.com](mailto:kmedeiroschmitt@gmail.com)
2. Mestranda do curso de Genética e Melhoramento de plantas (PGMP). Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta - MT, Brasil.
3. Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas. Professora do Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular. Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias. PPGBioAgro; PGMP; PPGBioNorte Universidade do Estado de Mato Grosso.
4. Doutorando do programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede BIONORTE. Universidade do Estado de Mato Grosso. Cáceres, Mato Grosso, Brasil.
5. Doutora em Ecologia e Recursos Naturais. Coordenadora estadual (MT) do Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, Docente do PPG BIONORTE e PPG-CA da Universidade do Estado do Mato Grosso. Cáceres, Mato Grosso, Brasil.
6. Rede Bionorte Projeto Conservação, uso e bioprospecção da biodiversidade da Amazônia Meridional (contribuição 14)

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

### RESUMO

O presente estudo objetivou padronizar um protocolo de extração e amplificação via PCR para *Curcuma longa* (açafrão) visando futuros estudos de diversidade genética por meio de marcadores ISSR. Os testes de extração do DNA de *C. longa* partiram do protocolo padrão de CTAB. Foram testadas duas concentrações de CTAB no tampão de extração (2% e 5%), três concentrações de  $\beta$ -mercaptoetanol (0, 1% e 2%) e um tempo de 5 minutos de incubação das amostras no banho Maria a 65°C. Os resultados demonstraram que o tampão com a concentração de 5% de CTAB foi eficiente para a extração de DNA da espécie, enquanto o tampão com a concentração de 2% de CTAB não foi eficiente. Quanto à concentração de  $\beta$ -mercaptoetanol no tampão de extração, observou-se que no protocolo com o CTAB 5%, nenhuma das três concentrações (0, 1% e 2%) interferiram no resultado, todas resultaram em quantidades satisfatórias de DNA. O tempo de 5 minutos de incubação das amostras a 60 °C foi eficiente para a espécie, pois resultou em um DNA passível de amplificação via PCR. Os *primers* ISSRs avaliados foram capazes de amplificar região do genoma de *C. Longa* revelando que podem ser utilizados em estudos posteriores de caracterização e análise de diversidade genética da espécie. O protocolo de extração e amplificação analisado neste estudo foi eficiente para a espécie e pode ser utilizado em futuros estudos de variabilidade genética nos genótipos cultivados pelos produtores.

**PALAVRAS – CHAVE:** Açafrão; CTAB; ISSR.

## ESTABLISHMENT AND STANDARTIZATION OF PROTOCOL FOR EXTRACTION AND AMPLIFICATION OF DNA IN LEAF TISSUE OF *Curcuma Long.* (L)

### ABSTRACT

The present study aims standardize a protocol for extraction and amplification via PCR for *Curcuma longa* (turmeric) aiming for future studies of genetic diversity using ISSR. Tests for DNA extraction of *C. longa* were based in standard CTAB protocol. Were tested two concentrations of CTAB in the extraction buffer (2 and 5%), three concentrations of  $\beta$ -mercaptoethanol (0, 1 and 2%) and a time of 5 minutes in sample incubation in water bath at 60 °C. The results demonstrated that the buffer with a concentration of CTAB 5% was efficient for the species DNA extraction, whereas the buffer with concentration of 2% was not efficient. Concerning to the  $\beta$ -mercaptoethanol concentration was observed that in the protocol with 5% of CTAB, none of the three concentrations (0, 1 and 2%) interfered in the result, all resulted in satisfactory amounts of DNA. The time of 5 minutes in incubation of the samples at 60°C was efficient to the species, because resulted in a DNA that can be amplified by PCR. The ISSR primers evaluated were capable of amplify the genome region of *C. longa* showing that can be use in other studies of characterization and analyze of genetic diversity of the species. The extraction and amplification protocol analyzed in this study was efficient to the species and can be use in future studies of genetic variability in the genotypes cultivated by the producers.

**KEYWORDS:** Turmeric; CTAB; ISSR.

### INTRODUÇÃO

*Curcuma longa* L., da família *Zingiberaceae*, conhecida como açafão-da-terra, cúrcuma, turmérico, açafão-da-índia, açafroa e gengibre amarelo, é uma planta originária da Índia e cultivada em todo o mundo tropical para uso medicinal e condimentar (HIKMAT ULLAH JAN 2011). Segundo SASIKUMAR (2005), o gênero apresenta aproximadamente 1.400 espécies descritas. Engloba cerca de 80 espécies de ampla ocorrência, cultivadas desde regiões situadas ao nível do mar até aquelas com mais de 2.000 metros de altitude. Dentre as espécies do gênero, a de maior destaque comercial é a *Curcuma longa* L. (SIGRIST, 2011).

Atinge em média de 120 a 150 centímetros de altura em condições favoráveis, suas folhas são grandes, oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas, sendo os pecíolos de mesmo tamanho dos limbos (HERTWIG, 1986). Estes se reúnem na base da planta, formando um pseudocaulé. A planta possui um rizoma principal denominado usualmente de 'cabeça' ou 'pião' o qual é periforme, arredondado ou ovóide. Ao redor destes, verificam-se ramificações secundárias (rizomas secundários) denominadas de 'dedos' (HERTWIG, 1986).

No mercado é considerada uma preciosa especiaria por compor os famosos temperos orientais (PEREIRA 2009). Na medicina tradicional chinesa, a cúrcuma tem sido usada para ajudar na digestão e função hepática, aliviar dores da artrite, regular a menstruação, tratar eczema, feridas, reduzir inflamações e, tem sido utilizada na prevenção e tratamento de câncer (MATOS, 2002).

No Brasil, a cúrcuma foi introduzida durante o período colonial e o cultivo permaneceu incipiente até a década de 60, quando se iniciou a produção mais expressiva na região do município de Mara Rosa (GO) visando atender a demanda por corantes naturais de indústrias paulistas (SIGRIST, 2011).

Os estudos de *C. longa* são escassos no Brasil, concentrando-se em países onde a cultura apresenta maior importância econômica e quase a totalidade destes estudos busca avaliar a diversidade genética (SIGRIST 2009). De acordo com RAVINDRAN et al. (2007), existe uma ampla variabilidade entre cultivares em relação a diversos parâmetros de crescimento, produtividade, resistência a estresses bióticos e abióticos, além de características qualitativas.

A extração e isolamento do DNA de plantas é a primeira etapa para a análise da estrutura e organização do genoma das mesmas. As preparações de DNA vegetal são utilizadas como substrato em reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para estudos filogenéticos, estudos de variabilidade, conservação e manejo de espécies. É, portanto um passo muito importante, pois independente da estrutura molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO & BRASILEIRO, 1998).

Com o desenvolvimento da técnica PCR os marcadores moleculares começaram a ser utilizados para detecção de polimorfismo genético, e passaram a ser conhecidos como descritores moleculares para identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, usados também para estudos de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento e parentesco, construção de mapas genéticos e seleção assistida por marcadores (MOREIRA 2012).

Segundo DANNER et al. (2011) a maioria dos protocolos de extração de DNA de plantas descrita na literatura utiliza o método baseado no detergente CTAB, com algumas modificações de acordo com características da espécie. Por isso, ajustes de protocolos são fundamentais, de forma a desenvolver procedimentos específicos, sendo assim, este estudo propôs padronizar um protocolo de extração para amplificação via PCR de *Curcuma longa* visando estudos de diversidade genética por meio de marcadores ISSR.

## **MATERIAL E METODOS**

Para realizar os testes de extração e amplificação foram coletados acessos de *C. longa* localizadas no município de Alta Floresta-MT. Os testes de extração do DNA de *C. longa* foram realizados através do protocolo de extração de tecidos vegetais CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) (DOYLE & DOYLE, 1987) com modificações nas concentrações de CTAB e  $\beta$ -mercaptoetanol.

Para a extração de DNA, cerca de 150 e 200mg de folhas foram trituradas e as paredes e membranas celulares foram rompidas por meio de maceração em almofariz na presença de nitrogênio líquido (Figura 01), sendo o pó resultante transferido para microtubos de 2 mL.



**FIGURA 01.** Tecido foliar de *C. longa* em almofariz de porcelana.

FONTE: SCHMITT, 2013.

Para cada tubo foram adicionados 800µL de tampão de extração CTAB 2% ou 5%, (100mM Tris-HCl (pH 8,0); 20mM de EDTA (ácido etileno diamono tetracético); 1,4M NaCl; polivinilpirrolidona (PVP); brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e β-mercaptoetanol com diferentes concentrações (0%, 1% e 2%). A mistura foi agitada em Vórtex por 1 minuto. A seguir, as amostras foram incubadas em banho maria a 65 °C por 5 minutos. Nesta etapa, ocorre a solubilização das membranas celulares. Percorrida esta etapa de incubação, as amostras foram retiradas do banho maria e resfriadas à temperatura ambiente. A seguir as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm, separando-se as fases orgânica e aquosa. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo. Para a extração dos ácidos nucléicos, foi adicionado 700 µL de solvente orgânico clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) com subsequente agitação por 1 minuto em vórtex.

As amostras foram novamente submetidas à centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm, separando-se em duas fases. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para um novo microtubo, no qual adicionou-se 500µL de isopropanol gelado e 1/3 do volume do sobrenadante de Acetato de Amônio, em seguida os tubos foram invertidos suavemente algumas vezes e incubados a -20 graus C, por 3 horas para precipitação. Após este período, os tubos foram novamente centrifugados, a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol a 70%, e uma vez com etanol a 95%. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 50µL de TE 0,1mM (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA). Adicionou-se RNase, na concentração final de 40µg/ml e incubou-se em banho-maria a 37 °C, por 30 minutos. As amostras foram acondicionadas a 4°C por uma noite e posteriormente armazenadas a -20°C para uso posterior.

Para quantificar o DNA extraído e avaliar a sua integridade foi realizado comparação com um DNA de massa molecular conhecida, após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,2 mg/mL). Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados por câmera

digital (Sony).

Foram testados quatro *primers* de ISSR obtidos da Universidade de British Columbia (UBC set nº 9) para amplificação inicial via PCR. As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ 96 (Biocycler), em um volume total de 20 µL contendo: 0,2µL de Taq DNA polimerase; 2µL Tampão 10x (10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 50 mM KCl, 0.1% de tween, 10; mM MgCl<sub>2</sub>); 2µL MgCl<sub>2</sub> (1Mm); 3 µL de *primer*; 4µL de dNTPs; 1µL DMSO; 1,5 µL de DNA; 6,3µL de água destilada e autoclavada.

O programa de amplificação foi de acordo com o descrito por NARAYANAM et al. (2006) 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos 47°C (dependendo do *primer* utilizado) por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 1 ciclo de extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão de corrida TBE 1X, em voltagem constante de 90 V por aproximadamente quatro horas. A coloração do gel foi feita com brometo de etídeo (0,2 mg/mL). Em seguida o gel foi fotografado sob luz ultravioleta usando Transiluminador UVB LTB-21x26 (Loccus Biotecnologia) e câmera digital (Sony).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da extração de DNA está demonstrado na figura 02. A concentração de CTAB no tampão de extração interferiu na quantidade de DNA extraído de *Curcuma longa*. O tampão com a concentração de 2% de CTAB não foi eficiente para a extração do DNA da espécie em estudo, enquanto que o tampão com o CTAB na concentração de 5% foi eficiente. O DNA extraído com a concentração de CTAB a 5% não apresentou arraste vertical no gel, revelando assim que o DNA não foi degradado por DNAses e/ou que não ocorreu quebra mecânica durante a extração com o clorofórmio. Também não foi observado retenção de DNA no poço, demonstrando que as amostras não foram contaminadas com polissacarídeos.

O β-mercaptoetanol é um dos antioxidantes utilizado para neutralizar a ação dos polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários no processo de isolamento de DNA (DEHESTANI & TABAR 2007). Para a espécie em estudo, foram avaliadas três concentrações de β-mercaptoetanol no tampão de extração de DNA, e conforme resultados obtidos, a concentração de β-mercaptoetanol não interferiu na quantidade e qualidade do DNA extraído com o CTAB na concentração de 5% (Figura 02).



**FIGURA 02.** Resultado da eletroforese da extração de DNA de *Curcuma longa*, com duas concentrações de CTAB e três de  $\beta$ -mercaptoetanol. Os números 0, 1 e 2 significam 0%, 1% e 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol respectivamente.  
 FONTE: SILVA, 2013.

VARELLA et al. (2013) em trabalho com *Averrhoa carambola* L testou protocolo de extração com CTAB nas concentrações de 2% e 5%, assim como no presente estudo o CTAB 2% não se mostrou eficiente enquanto o 5% se mostrou eficaz, resultados semelhante encontrado por SHIKHA SINGH 2011 para *C. Longa*.

O aumento na concentração de CTAB para 5% no tampão possibilitou a extração de um DNA de melhor integridade, menos viscoso e, portanto mais fácil de manusear no processo de extração, sugerindo elevado efeito desse componente sobre a qualidade de extração de DNA de tecidos foliares da espécie *C. longa*. Segundo ROMANO & BRASILEIRO (1999) o CTAB é utilizado para separar os ácidos nucleicos dos polissacarídeos, já que estes possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente, podendo, portanto com os resultados obtidos neste estudo, inferir que o material foliar da espécie *C. longa* possui grande quantidade de polissacarídeos, uma vez que a extração com o CTAB 2% no tampão não foi eficiente para a extração do DNA da espécie.

SIGRIST (2011) em trabalho com mesma espécie apresenta um protocolo mais longo, em relação a incubação no banho maria, sendo 60 minutos a 65°C, se comparado com o presente estudo, onde as amostras foram incubadas por 05 minutos a 65°C, no entanto igualmente eficaz na realização da PCR.

SYAMKUMAR (2006) em estudo com *cúrcuma ssp.* estabeleceu um protocolo para a extração de DNA através do rizoma, porém com um período de 60 minutos de incubação das amostras no banho maria, bem como MARIESCHI (2012) em estudo com várias espécies do gênero, propôs um protocolo com concentração de 4% de CTAB e 60 minutos de incubação também. O maior tempo de incubação no banho maria das amostras de DNA pode ocasionar a degradação do material, portanto o protocolo estabelecido neste estudo para *C. longa* onde as amostras permaneceram incubadas por 5 minutos é vantajoso, pois além de prevenir a degradação reduz o tempo de trabalho no laboratório.

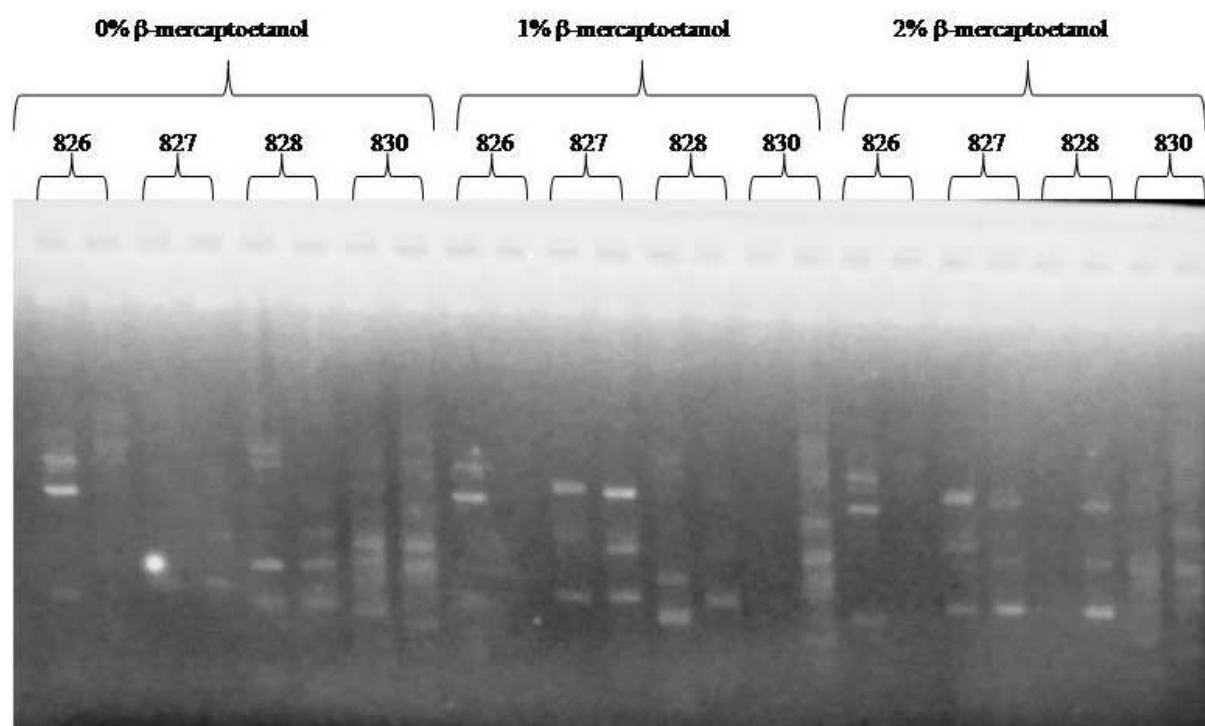
A amplificação do DNA extraído com o protocolo de CTAB 5% com diferentes concentrações de  $\beta$ -mercaptoetanol foi testada com 4 primers ISSR (UBC: 826, 827, 828 e 830) (Tabela 01).

**TABELA 1.** Relação dos quatro *primers* ISSR testados para a amplificação do DNA da espécie *Curcuma longa*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
UBC 826 (AC) <sub>8</sub> C	5' – ACACACACACACACACC – 3'
UBC 827 (AC) <sub>8</sub> G	5' – ACACACACACACACACG – 3'
UBC 828 (TG) <sub>8</sub> A	5' TGTGTGTGTGTGTGTGA 3'
UBC 830 (TG) <sub>8</sub> G	5' – TGTGTGTGTGTGTGTGG – 3'

FONTE: SILVA, 2013.

Os quatro *primers* ISSR testados foram capazes de amplificar regiões do genoma de *Curcuma longa*, conforme demonstrado na Figura 03. Todos os DNAs extraídos com o tampão de CTAB na concentração de 5%, independente da concentração de β-mercaptoetanol, foram passíveis de amplificação pelos *primers* ISSR testados, porém observa-se que as bandas resultantes da amplificação do DNA extraído com a concentração de 0% β-mercaptoetanol apresentaram menor definição.



**FIGURA 03.** Gel de agarose 1,5%, com teste de amplificação do DNA de dois indivíduos de *C. longa*, com quatro *primers* ISSR, em diferentes concentrações de β-mercaptoetanol conforme identificação no gel.

FONTE: SILVA, 2013.

A integridade do DNA é de fundamental importância para uma boa reprodutibilidade dos produtos de amplificação dos marcadores moleculares. Porém a quantidade de contaminantes presente no material extraído pode inviabilizar a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis por meio da PCR (FALEIRO et al. 2003), o que não foi observado neste estudo, pois o DNA extraído com o tampão na concentração de 5% foi passível de amplificação via PCR com os marcadores ISSR,

sendo que os produtos de amplificação mostraram-se mais nítidos nas concentrações de 1 e 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 03).

### CONCLUSÕES

A extração de DNA de *C. longa* foi mais eficiente com o tampão de CTAB na concentração de 5%, com  $\beta$ -mercaptoetanol nas concentrações de 1% e 2% e com um tempo de 5 minutos de incubação no banho Maria a 60 °C, pois resultou em um DNA passível de amplificação via PCR. Os *primers* ISSRs amplificaram regiões do genoma de *C. Longa* e portanto podem ser utilizados em estudos de caracterização e análise de variabilidade genética em genótipos de açafrão.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de IC a primeira autora e a Rede Bionorte Projeto: Conservação, uso e bioprospecção da biodiversidade da Amazônia Meridional- Mato Grosso MCTI/CNPq/FAPEMAT (Contribuição Nº. 14).

### REFERÊNCIAS

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília (DF): Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), p. 309, 1998.

DANNER, M. A; SASSO, S. A. Z; BITTENCOURT, J. V. M; CITADIN, I; SACHET, M. R. Proposta de Protocolo para Extração de DNA de Jabuticabeira. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 2, p. 363-367, 2011.

DEHESTANI, A; TABAR, S. K. K. A Rapid Efficient Method for DNA Isolation from Plants With High Levels of Secondary Metabolites. **Asian of Plant Sciences**, v. 6, p. 977-981, 2007.

DOYLE, J. J; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p.11–15, 1987.

FALEIRO, F. G; ARAÚJO, I. S; BAHIA, R. C. S; SANTOS, R. F; YAMADA, M. M; ANHERT, D. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. **Agrotrópica**, v.14, n.2, p.31-34, 2003.

HIKMAT, U. J; RABBANI, M. ASHIQ; SHINWARI, Z. K. Assessment of genetic diversity of indigenous turmeric (*Curcuma longa* L.) germplasm from Pakistan using RAPD markers. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 5, p. 823-830, 2011.

HERTWIG, L. F. V. Plantas aromáticas e medicinais. **São Paulo: Icone**, p.254-265, 1986.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 4. ed. Fortaleza : Ed. Universidade Federal do Ceará, p. 267, 2002.

MARIESCHI, M., TORELLI, A.; BRUNI, R. Quality control of saffron (*Crocus sativus*



L.): development of SCAR markers for the detection of plant adulterants used as bulking agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 10998 - 11004, 2012.

MOREIRA, G. B. R. Diversidade Genética e Estabelecimento de Protocolo Para Micropropagação de *Tectona grandis*. **Dissertação (mestrado) Universidade Estadual de Montes Claros -Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido/PPGPVSA**, Janaúba-MG, 96fls. 2012.

PEREIRA, R. C. A.; MOREIRA, M. R. Cultivo de *Curcuma longa* L. (Açafrão-da-índia ou Cúrcuma). **Comunicado Técnico 142 Embrapa**. ISSN 1679-6535, 2009.

RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N.; SIVARANAN, K. Turmeric: The genus *Curcuma*. **Medicinal and aromatic plants – Industrial profiles**, p.484, 2007.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.

SASIKUMAR, B. Genetic resources of *Curcuma*: diversity, characterization and utilization. **Plant Genetic Resources**, v.3, n.2, p. 230-251, 2005.

SIGRIST, M. S.. Divergência genética em *Cúrcuma longa* L. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos. **Dissertação (Mestrado Agricultura Tropic e Subtropical) - Instituto Agrônomo, Campinas-SP**, 82fls. 2009.

SIGRIST, M. S.; PINHEIRO, J. B.; AZEVEDO FILHO J.A.; ZUCCHI, M. I. Genetic diversity of turmeric germplasm (*Curcuma longa*; Zingiberaceae) identified by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n.1, p. 419-428, 2011.

VARELLA, T. L; LAGE, L. A; SILVA, A. B; OLIVEIRA, T. C; CABRAL, J. C; BARELLI, M. A. A; SILVA, M. L; ROSSI, A. A. B. Padronização de Protocolo de Extração de DNA Genômico de *Averrhoa carambola* L. e Testes Com Marcadores ISSR. **7º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Anais...** p. 239-249, 2013.