

## AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE RAPD DE ACESSOS DE MANIÇOBA (*Manihot pseudoglaziovii* PAX & HOFFM.) E DE DUAS ESPÉCIES AFINS DE INTERESSE FORRAGEIRO

Fabiana Augusta Santiago Beltrão

Aluna de Mestrado, PPGZ/CCA/UFPB, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, CEP 58.397-000, Areia -PB, e-mail: fabianasantiagobeltrao@yahoo.com.br

Divan Soares da Silva

Prof. Adjunto, UFPB, Departamento de Zootecnia, CEP 58.397-000, Areia-PB, e-mail: divan@cca.ufpb.br

Romulo Marino Lamoca-Zarate

Prof. Adjunto, UFPB, Departamento de Biologia molecular, CEP 58.051-907, Joao Pessoa-PB, e-mail: llamazaro@dbm.ufpb.br

Leonardo Pessoa Felix

Prof. Adjunto, UFPB, Departamento de Botanica, CEP 58.397-000, Areia-PB, e-mail: lpfelix@hotmail.com

Annie Elisabeth Santiago Beltrão

Pesquisador, UFPB, Laboratório de tecnologia Farmacêutica, CEP 58.051-907, Joao Pessoa-PB, e-mail: annie@lftf.ufpb.br

**RESUMO** – Com o objetivo de analisar a variabilidade genética em populações naturais, foram estudados 14 acessos de *Manihot pseudoglaziovii*, coletados no estado da Paraíba na microrregião Curimataú Paraibano, além de um acesso de *M. esculenta* Cranz (mandioca) e de um híbrido natural entre essas duas espécies. Cinco plantas de cada acesso foram multiplicadas através de estaquia e em seguida cultivadas em uma área experimental em condições padronizadas, para se ter uma exteriorização homogênea de cada genótipo. Foram testados dois métodos de extração do DNA. O protocolo de extração usando o detergente CTAB possibilitou obter produtos limpos, menos viscosos e oxidados. Na análise de variabilidade genética foram usados um total de 10 iniciadores (*primers*), e apenas 3 produziram bandas OPD2, OPD3 e OIPD8, o iniciador OPD2 apresentou maior percentagem de polimorfismo seguido do OPD3, com valores de 30,7% e 42,8%, respectivamente. Estes iniciadores podem discriminar diferenças moleculares entre os acessos de maniçoba e de duas espécies afins.

Palavras Chaves: Reação em cadeia da polimerase, diversidade genética, Maniçoba.

## GENETIC DIVERSITY EVALUATION OF ACCESSES MANIÇOBA (*Manihot pseudoglaziovii* PAX & HOFFMANN.) AND OF TWO SIMILAR SPECIES OF FORAGER INTEREST BY RAPD

**ABSTRACT** -With the objective to analyze the genetic variability in natural populations, 14 accesses of *Manihot* had been studied *pseudoglaziovii*, collected in the state of the Paraíba, in the microregion Curimataú Paraibano, beyond an access of *M. esculenta* Cranz (cassava) and a natural hybrid between these two species. Five plants of each access had been multiplied through statue and after that cultivated in an experimental area in standardized conditions, to have a homogeneous exteriorization of each genotype. The optimization of the protocol of extraction of the DNA of some accesses of maniçoba and of two similar species of forager interest and to verify the genetic variability through the amplification with molecular markers RAPD saw PCR. Two methods of extraction of the DNA had been tested. The extraction protocol using detergent CTAB made possible to get clean products, less viscous and oxidized. In the analysis of genetic variability they had been used in a total of 10 starters (primers), and only 3 had produced bands, starter OPD2, OPD3 and OPD8 presented greater percentage of polymorphism followed of the OPD2, with values of 30,7% and 42,8%, respectively. These primers can discriminate molecular differences between the accesses of maniçoba and two similar species.

**Key words:** Polymerase Chain Reaction, genetic diversity, Maniçoba, extraction.

## INTRODUÇÃO

O nome maniçoba tem sido usado para designar algumas espécies do gênero *Manihot*, existe uma certa discrepância, nas informações dos estudiosos, com relação à classificação botânica das plantas como espécies ou variedades de uma mesma espécie (SALVIANO & NUNES, 1991). A identificação das diferentes variedades de maniçoba com características forrageiras através da taxonomia tradicional é dificultada por varias razões: os fenótipos, com grande variedade de acordo as condições ecológicas, que existe em grande número de populações que se reproduzem vegetativamente e sexualmente; a existência de numerosos híbridos, como por exemplo, em muitas das espécies que florescem durante o mesmo período do ano e que não estão separadas por barreiras biológicas (SCHEINVAR, 1995). Além disso, a maniçoba é predominantemente encontrada em forma silvestre e em áreas cultivadas de pequenos agricultores que a selecionam e identificam, dessa forma uma mesma variedade pode receber mais que uma denominação, podendo haver um mesmo nome para diferentes espécies.

Até o momento, nenhum estudo foi publicado sobre o uso de marcadores moleculares de DNA para estimar a diversidade genética na maniçoba. Este marcador, baseado em variações de seqüências de DNA tem demonstrado ser uma ferramenta extremamente efetiva para mapeamento e diagnósticos genéticos, taxonomia molecular, análise de integridade genética, estudos evolutivos e estudos citológicos para confirmar o modo de reprodução por apomixias versus autopolinização, haplóides por partenogênese ou fertilização cruzada. As vantagens no uso desses marcadores residem no fato deles existirem em número praticamente ilimitado, não estarem sujeitos a efeitos pleitrópicos, epistáticos ou ambientais e poderem ser determinados em qualquer tipo de tecido ou estagio de desenvolvimento da planta (MICHELMORE & HULBERT, 1987). Esses marcadores, quando combinados a características fenotípicas, fornecem um bom quadro para agrupamento de genótipos e para o planejamento de cruzamentos. Além disso, podem auxiliar na avaliação da redundância e deficiências das coleções de germoplasma (FERREIRA & GRATTAPACLIA, 1996).

Reações em cadeia de Polymerase (PCR) foi conhecida por Mullis & Faloona (1987), sendo um método de amplificação de DNA de segmentos específicos, podendo ser facilmente

detectado a olho nu em gel de eletroforese através de corantes específicos. A reação baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polymerase. Sua reação baseia-se no anelamento e extensão enzimática de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores ("primers") que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação.

Para que tenha êxito o PCR depende justamente da habilidade das enzimas copadoras de DNA permanecerem estáveis em alta temperatura. Atualmente, é utilizada a DNA polimerase isolada da bactéria hipertermofílica *Thermus aquaticus* (SAIKI *et al.*, 1998), sendo denominada *Taq* polimerase.

O processo de PCR consiste em três etapas. A primeira é a desnaturação, onde a fita dupla de DNA alvo é desnaturada pela elevação da temperatura para 96°C, sendo dividida em duas fitas simples. Em seguida a temperatura diminui para 55°C aonde os primers vão se anelar às seqüências complementares no DNA. Na terceira etapa a temperatura é novamente elevada para 75°C para que a *Taq* polimerase trabalhe melhor, adicionando nucleotídeos a partir dos primers fazendo uma cópia completa dos moldes.

Os segmentos de DNA são sintetizados em uma progressão geométrica, pois a cada ciclo origina-se um novo segmento a partir do inicial e de cada um dos segmentos já produzidos no ciclo anterior (BORBA, 2000). Este ciclo é repetido umas 30 vezes, onde depois de algumas horas tem-se mais de um milhão de cópias de um determinado segmento de DNA. O resultado da amplificação de ácidos nucléicos por PCR pode ser facilmente visualizado por eletroforese em gel de agarose, o sucesso da amplificação depende das condições de reação, da pureza dos reagentes utilizados e dos diferentes parâmetros da reação (BORBA, 2000).

Existem diferentes tipos de marcadores de acordo com o nível da expressão. Os marcadores morfológicos, são observados no último nível da expressão do caráter. Já os marcadores bioquímicos, ou isoenzimas, detectam o polimorfismo da molécula de DNA, sendo importantes marcadores, pois são utilizados em todas as espécies de plantas. E os marcadores moleculares, que operam no DNA são os sistemas mais diretos, onde a análise é feita diretamente na macromolécula portadora de toda a informação genética. Então se pode definir como marcador molecular todo e qualquer

fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPACLIA, 1998).

Os marcadores moleculares têm demonstrado ser uma ferramenta efetiva para o mapeamento e diagnósticos genéticos, taxonomia molecular, análises da integridade genética e estudos evolutivos (CARNEIRO, 1997). A tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR, abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético básico. O estudo de genoma de plantas tem se beneficiado, sobretudo, dos avanços obtidos na área de genética humana. Métodos estatísticos acompanham este desenvolvimento, e tem permitido a manipulação de enormes quantidades de dados genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), foi desenvolvida independentemente por dois grupos de pesquisadores nos EUA. Williams *et al.* (1990), RAPD, que é baseado na reação de "Polymerase Chain Reaction" (PCR), com duas características distintas: utiliza pequenas seqüências de oligonucleotídeos de DNA de fita simples, "primers", ao invés de um par de "primers" tem seqüência arbitrária com cerca de 50-80% de G + C, a seqüência alvo é desenvolvida. As diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do "primer" com o sítio de iniciação e assim impedindo a amplificação de um segmento (WILLIAMS *et al.*, 1993).

O polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. Devido a grande quantidade de DNA produzido, podem ser visualizados diretamente na forma de uma banda em gel de eletroforese, corados com brometo de etídio e observados na luz ultravioleta (WILLIAMS *et al.*, 1990 ; FERREIRA & GRATTAPACLIA, 1996).

A técnica de RAPD tem grandes vantagens em relação às outras técnicas moleculares. Nesta técnica é necessária de uma quantidade mínima de DNA para a análise genotípica de um indivíduo (da ordem de dezenas de nanogramas). Permite ainda gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo, oferecendo a possibilidade de mostrar regiões de DNA repetitivos, uma vez que os "primers" utilizados para a detecção da variação ao nível de DNA são arbitrários. RAPD reúne, portanto, a simplicidade da visualização direta dos marcadores de DNA. Além disso é uma técnica mais simples e rápida do que o RFLP, pois não necessita de informações sobre o DNA alvo (CARNEIRO, 1997).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo prover os forragicultores e melhoristas com uma ferramenta que possibilite não apenas a identificação taxonômica precisa de uma importante forrageira nativa, como também aperfeiçoar a utilização dessas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em condições de campo no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em Areia-PB. O município localiza-se na microrregião do Brejo Paraibano, a uma altitude de 618m, situando-se entre as coordenadas geográficas 06° 57'48" de altitude sul e 35° 41'30" de longitude oeste de Greenwich, com clima quente e úmido e precipitação anual de 1200 mm, com médias de temperaturas máximas de 28°C e mínimas de 21°C.

Foram obtidos 14 acessos de *Manihot pseudglaziovii* com diferenças visuais distintas, coletados ao longo da rodovia Br 104 entre os Municípios de Remígio e Barra de Santa Rosa, estado da Paraíba. Também foram incluídos, para comparação, um acesso de *M. esculenta* Cranz (Mandioca) e um híbrido natural entre essas duas espécies (pornuncia), ambos provenientes do município de Areia (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos acessos de maniçoba e de duas espécies afins.

Identificação da amostra	Espécie
2.amostra	Mandioca
3.amostra	Maniçoba
6.amostra	Maniçoba
9.amostra	Maniçoba
10.amostra	Maniçoba
13.amostra	Maniçoba
14.amostra	Maniçoba

Cinco plantas de cada acesso foram multiplicadas através de estaquia e em seguida cultivadas em uma área experimental em condições padronizadas de adubação e rega, para se ter uma exteriorização homogênea de cada genótipo. De cada acesso foram preparadas exsiccatas que encontram-se depositadas no Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes (CCA/UFPB).

Inicialmente foi realizada a produção de mudas de maniçoba, estas mudas foram feitas através de estaquia, com tamanho de 30 cm e com corte em Bisel na parte inferior. As mudas foram transplantadas para sacos de polietileno preto (23 x 13 cm), onde permaneceram por 3 meses, sendo, em seguida, transplantadas para o campo de produção, em um solo classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo Eutrófico, apresentando as seguintes características químicas: pH 5,0, P(mg/dm<sup>3</sup>) 5,47, K(mg/dm<sup>3</sup>) 42,08, Al<sup>3+</sup>(cmol/dm<sup>3</sup>) 0,25, Ca<sup>2+</sup>(cmol/dm<sup>3</sup>) 0,90, Mg<sup>+</sup>(cmol/dm<sup>3</sup>) 0,90, CTC (cmol/dm<sup>3</sup>) 4,23 e MO (g/dm<sup>3</sup>) 10,39.

O solo foi preparado mediante limpa do terreno e preparo das covas, e aplicação de 1,0 t/ha de calcário dolomítico.

A adubação orgânica de fundação foi feita uma semana antes do plantio, de acordo com a recomendação do Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, aplicando-se 1,8 kg de adubo orgânico por cova. O plantio foi realizado em covas num espaçamento de 1,5 m entre plantas e 2,0 m entre blocos.

Foram realizados os tratamentos culturais como regas, capinas com auxílio de enxadas, e aplicação de defensivos agrícolas para o controle de formigas e ácaros.

O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos casualizados com 16 tratamentos e cinco repetições.

De cada planta estudada foram retiradas 2 folhas jovens para extração do DNA no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do DBM/CCEN/UFPB.

### Extração de DNA

Foram utilizados dois diferentes protocolos na extração de DNA.

Primeiramente foi seguido o protocolo definido por Dellaporta (1983). Foram transferidas amostras de 250 mg de tecido vegetal, para o pilão e adicionado 300 µL da solução 1-(mais 2-βmercaptoetanol, na quantidade de 7 µL/10mL) – As folhas foram maceradas, e a mistura foi transferida para

microtubos de 2 mL e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 20 µL da solução 2 e a mistura foi homogeneizada e levada a banho-maria a 65°C por 10 minutos. Depois de retirada do banho-maria foi adicionado 200 µL da Solução 3 e a mistura foi agitada vigorosamente e incubada no gelo por 20 minutos. Decorrido este tempo à mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para novos microtubos (1,5 mL) e o DNA foi precipitado pela adição de 800 µL de isopropanol a 20 °C, a mistura foi homogeneizada vagarosamente e incubada a -20°C por 30 minutos. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e imediatamente centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos. Sendo então o precipitado seco à temperatura ambiente, com os microtubos invertidos em papel toalha. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL de tampão TE, e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos (1,5 mL) e foi adicionado 33 µL da solução de acetato de sódio à 3M e 900 µL de etanol absoluto (gelado) e foi homogeneizado vagarosamente. A seguir a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% (gelado). Por último o precipitado foi colocado para secar a temperatura ambiente por 15-30 minutos e ressuspenso em 50 µL de tampão TE e foi armazenado a -20°C até sua utilização.

O segundo protocolo é baseado na utilização do detergente CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Amostras de 250 mg de tecido vegetal, foi transferido para o pilão e adicionado 700 µL da solução de extração CTAB (mais 1 % de 2-βmercaptoetanol). A folhas foram maceradas e em seguida a mistura foi transferida para microtubos (2mL), e levada a banho – maria a 65°C por 30 minutos. Depois de retirada do banho – maria esperou-se esfriar por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 700 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), invertendo cuidadosamente durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi retirado (430 µL) para novo microtubos (1,5 mL).

Em seguida foi adicionado a mistura 430 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. Novamente foi retirado o sobrenadante e transferido para novo microtubos (1,5mL). A mistura então foi precipitada com 2/3 do volume de isopropanol a -20°C, sendo homogeneizada

vagarosamente e incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% (gelado) no shaker por 20 minutos, e centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos, duas vezes consecutivas. Decorrido esse tempo foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos e o precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de NaCl a 1M.

O pellet foi dissolvido ao máximo, aquecendo o microtubos em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$ . A mistura foi incubada por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Então foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para novo microtubos e precipitado com 2/3 do volume de isopropanol e incubado por 45 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Em seguida a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 3 minutos e o pellet foi lavado com 1 mL de etanol (gelado) no shaker por 20 minutos, duas vezes. E por último o precipitado foi seco a temperatura ambiente por 15-30 minutos e ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de tampão TE, e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

concentração de DNA de cada amostra foi feita a leitura na absorbância com comprimento de onda de 260 nm, que mede a quantidade de ácidos nucleicos presente na amostra, em seguida a leitura foi feita na absorbância de 280 nm, que mede a quantidade de polissacarídeos na amostra. E por último a leitura feita no comprimento de onda de 310 nm, que estima a presença de compostos fenólicos e/ou de proteínas. A leitura nessa absorbância tem que ser baixa próxima de zero, mostrando assim que as amostras estão puras. A razão entre as leituras  $A_{260}$  e  $A_{280}$  em um DNA puro deve estar entre 1,8 e 2,0. Razão menor significa contaminação com proteínas, razão maior indica contaminação com fenol (ROMANO, 1998).

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Eletroforese.

A reação de amplificação foi baseada no protocolo estabelecido por Kary Mullis (IQBAL *et al.*, 1997). Cinco primers de fita única (Tabela 2), foram utilizados para a reação em cadeia de polimerase (PCR).

Para a amplificação foi utilizado um volume

Tabela 2. Iniciadores (primers) com suas correspondentes seqüências de nucleotídeos.

Iniciador (primer)	Seqüência
OPD1	5' -ACC GCG AAG G - 3'
OPD2	5' - GCA CCC AAC C - 3'
OPD3	5' - GTC GCC GTC A - 3'
OPD4	5' -TCT GGT GAG G - 3'
OPD5	5' - TGA GCG GAC A - 3'
OPD6	5' -ACC TGA ACG G - 3'
OPD7	5' -TTG GCA CGG G - 3'
OPD8	5' -GTG TGC CCC A - 3'
OPD9	5' -CTC TGG AGA C - 3'
OPD10	5' -GGT CTA CAC C - 3'

Foram efetuadas duas extrações do DNA/cultivar para que fosse utilizada a extração de melhor resultado para a amplificação por PCR.

#### Quantificação por espectrofotometria

Para a determinação da concentração de DNA foi utilizada a leitura em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância em comprimento de onda de 260 nm ( $A_{260}$ ), e a concentração foi determinada pela seguinte fórmula (ROMANO, 1998):

$$[\text{DNA}] = 50\mu\text{g/mL} \times D \times A_{260}$$

onde o D é o fator de diluição usado para fazer a leitura no espectrofotômetro.

Foi utilizado para a preparação da amostra 995  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q e 5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA (diluição 1: 200). Para se obter a

final de 50 $\mu\text{L}$ , contendo os seguintes componentes em suas concentrações finais: 5ng/ $\mu\text{L}$  da amostra de DNA; 25 $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix (0,5unitis/mL Taq polimerase (pH 8,5); 400 $\mu\text{M}$  de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3mM de  $\text{MgCl}_2$ ); 15 $\mu\text{L}$  de Nuclease- Free Water; 10 $\mu\text{M}$  de primer. A mistura foi coberta com 50 $\mu\text{L}$  de óleo mineral para não ocorrer evaporação durante a reação.

As amplificações foram feitas em um termociclador (M J Research, Mini Cycler<sub>TM</sub>) utilizando a seguinte programação: Primeiro ciclo com temperatura a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguido de 40 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $36^{\circ}\text{C}$  por 1 min e  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min (desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente). A reação foi finalizada com um ciclo a  $72^{\circ}\text{C}$  por 4 min, e mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15

minutos. A amostra foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Para a separação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, foi utilizado cuba de eletroforese (85 x 60 mm) contendo 30 mL de gel de agarose a 1.2% em tampão TBE 0,5X e 2  $\mu\text{L}$  de Brometo de etídio (10mg/mL). As amostras de corrida foram preparadas utilizando-se 8  $\mu\text{L}$  da amostra de PCR misturados com 3  $\mu\text{L}$  do corante de corrida (4,0 g de glicose, 0,025 g de azul de bromofenol, 0,025 g de xileno cianol e 10 mL de água destilada) e 4  $\mu\text{L}$  do marcador de peso molecular 1Kb misturado com 2  $\mu\text{L}$  do corante de corrida. As amostras foram corridas a 70 volts, aproximadamente por 40 minutos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estabelecimento do protocolo de extração de DNA.

O protocolo proposto por Dellaporta *et al* (1983), para a extração de DNA de plantas do genero *Manihot*, não obteve resultados satisfatórios. As amostras (pellets) de DNA ficaram muito grandes, viscosas e com uma coloração marrom, no final do processo. Um sinal de excesso de contaminantes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Na quantificação das amostras por espectrofotometria (Tabela 3), a razão entre as leituras de  $A_{260\text{nm}}$  e  $A_{280\text{nm}}$ , que

$A_{310}$ , e a relação de  $A_{260}/A_{280}$  apresentaram valores entre 1,8 – 2,0 indicando ausência de compostos fenólicos, contaminação com proteínas e carboidratos (ROMANO, 1998).

A utilização de CTAB a 2% auxiliou no processo de remoção de polissacarídeos, assim mesmo a utilização de PVP a 1% e 2- $\beta$ mercaptoetanol a 1% beneficiaram na qualidade do DNA, reduzindo as ações de endonucleases e diminuindo a atividade enzimática de peroxidases e polifenoloxidasas (CARNEIRO, 1997). Para a obtenção de DNA mais limpo foi utilizado também, uma lavagem com NaCl a 1M e duas lavagens adicionais com álcool a 70% por 20 minutos. Isto é recomendado quando se observa um pellet de DNA muito grande, viscoso e/ou escuro (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

### Análise de RAPD

A amplificação, através do PCR das amostras de DNA dos acessos de maniçoba e de duas espécies afins com 10 diferentes iniciadores foram corridas por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e fotografada no Imager Master, (Pharmacia Biotech), e esta informação foi analisada para observação da nível molecular dos cultivares.

Foram 10 iniciadores (primers) utilizados, e apenas 3 iniciadores (OPD2, OPD3 e OPD8),

**Tabela 3.** Leituras de absorvância e quantificação das amostras de DNA (Maniçoba), extraídos pelo método de Dellaporta *et al* (1983).

Amostra	Absorvância (nm)			Razão $A_{260}/A_{280}$	[DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{310}$		
1.Amostra	12,600	8,700	0,0015	1,448	0,732 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2.Amostra	4,095	2,018	0,0079	2,029	0,786 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

mede a pureza das amostras, mostrou valores abaixo do esperado. Uma provável explicação, para esse resultado seria a contaminação das amostras por compostos fenólicos, nas amostras em que a razão foi maior que 2,0, e nas amostras em que a razão foi menor que 1,8 estavam contaminadas com proteínas (ROMANO, 1998). A coloração marrom é devido à oxidação dos compostos fenólicos, em agentes oxidantes que danificam o DNA.

O protocolo de extração de DNA usando o detergente CTAB possibilitou obter produtos menos viscosos e oxidados. A quantificação das amostras de DNA por espectrofotometria (Tabela 4), apresentaram valores próximo de zero na

produziram bandas. Os 3 iniciadores apresentaram um total de 22 bandas, com uma média de 7,1 bandas por iniciador, incluindo 8 bandas polimórficas. O número de bandas por iniciador variou de 2 a 13 bandas. Os outros iniciadores não produziram fragmento amplificado, enquanto que o iniciador OPD2 produziu o maior número de fragmentos amplificados 13 e 4 bandas polimórficas. Enquanto que o iniciador OPD8 produziu 2 fragmentos amplificados e nenhuma banda polimórfica. O iniciador OPD3 produziu 6 fragmentos amplificados e 1 fragmento com bandas polimórficas. Assim observamos, que o iniciador OPD3 apresentou maior percentagem

**Tabela 4.** Leituras de absorbância e quantificação das amostras de DNA extraídos pelo método de CTAB (Doyle & Doyle, 1987).

Amostra	Absorbância			Razão $A_{260}/A_{280}$	[DNA] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{310}$		
2.mandioca	1,1285	0,6062	0,0086	1,861	0,99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
3.maniçoba	1,5712	0,7923	0,0129	1,983	1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
6.maniçoba	0,6791	0,3629	0,0001	1,871	0,96 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
9.maniçoba	0,4087	0,2266	0,0049	1,803	0,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
10.maniçoba	0,6059	0,3240	0,0018	2,001	0,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
13.maniçoba	0,5843	0,3082	0,0090	1,895	0,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
14.manipeba	0,6483	0,3509	0,0063	1,847	0,99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

de polimorfismo seguido do OPD2, com valores de 42,8% e 30,7%, respectivamente (Tabela 5).

*Manihot pseudglaziovii* Paz & Hoffm. Já as amostras 10 e 13 apresentaram diferenças

**Tabela 5.** Produtos da amplificação através de RAPD - PCR das amostras de DNA dos acessos de maniçoba e de duas espécies afins, usando 10 iniciadores.

Iniciador	Seqüência 5' - 3'	Total de bandas amplificadas	Número de polimorfismo	% de polimorfismo
OPD1	5'-ACC GCG AAG G- 3'	-	-	-
OPD2	5'-GCA CCC AAC C- 3'	13	4	30,7%
OPD3	5'-GTC GCC GTC A- 3'	7	3	42,8%
OPD4	5'-TCTGGTGAG G- 3'	-	-	-
OPD5	5'-TGAGCGGAC A- 3'	-	-	-
OPD6	5' _ACCTGAACG G_ 3'	-	-	-
OPD7	5' _TTG GCACGG G_ 3'	-	-	-
OPD8	5' _GTGTGC CCC A_ 3'	2	1	50%
OPD9	5' _CTC TGG AGA C_ 3'	-	-	-
OPD10	5' _GGT CTA CAC C_ 3'	-	-	-

O tamanho e a distribuição das bandas amplificadas usando os 10 iniciadores estão descritas na tabela 7 e são observados nas figuras 1, 2 e 3. Foi observado que os iniciadores geraram uma série de bandas polimórficas se estendendo de 450 pb até 1850 pb (OPD2).

Os resultados obtidos com o iniciador OPD8 que apresentou 2 1 bandas polimórfica, sendo esta de 1 polimórfica, com peso molecular de 950 pb nas amostras 3 e 10 13.

A separação dos fragmentos, amplificados via RAPD - PCR, em gel de eletroforese revelaram diferenças moleculares entre as amostras do gênero *manihot*: mandioca, maniçoba e manipeba. Com o aparecimento de bandas semelhantes, com o mesmo peso molecular, nas amostras 3, 6 e 9 (maniçoba) estas amostras comprovam ser mesma uma única espécie

moleculares das amostras anteriormente referenciadas. Podendo ser descritos como variedades diferentes de *Manihot pseudglaziovii* Paz & Hoffm.

Com a separação dos fragmentos, amplificados via RAPD - PCR, em gel de eletroforese revelaram diferenças entre os cultivares maniçoba, mandioca e manipeba pois cada espécie apresentou peso específico.

Com o aparecimento de bandas nas amostras 3, 6, 9 e 10 (maniçoba) com mesmo peso molecular, apresentando características semelhantes comprovando ser uma única espécie *Manihot pseudglaziovii* Paz & Hoffmann. Já as amostras 10 e 13 apresentaram variações no peso molecular, podendo ser descritos como variedades diferentes de *Manihot pseudglaziovii* Paz & Hoffmann.

**Tabela 6.** Distribuição e tamanho das bandas amplificadas através de RAPD das amostras de DNA dos acessos de maniçoba e de duas espécies afins, usando 10 iniciadores.

indicador	Tamanho das bandas amplificadas	Distribuição das bandas						
		2	3	6	9	10	13	14
OPD1	-	-	-	-	-	-	-	-
	1850	-	+	+	+	+	-	+
OPD2	1550	-	-	-	-	-	-	+
	950	+	-	-	-	+	-	-
OPD3	450	+	+	+	+	-	-	+
	1850	-	+	+	+	-	-	-
OPD4	1450	-	-	-	-	-	-	+
	950	-	+	+	+	-	-	-
OPD5	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD6	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD7	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD8	950	-	+	-	-	-	+	-
OPD9	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD10	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 7.** Distribuição e tamanho das bandas amplificadas através de RAPD – PCR das amostras de DNA dos acessos de maniçoba e de duas espécies afins, usando os 10 iniciadores.

indicador	Tamanho das bandas amplificadas	Distribuição das bandas nas amostras						
		2	3	6	9	10	13	14
OPD1	-	-	-	-	-	-	-	-
	1850	-	+	+	+	+	-	+
OPD2	1550	-	-	-	-	-	-	+
	950	+	-	-	-	+	-	-
OPD3	450	+	+	+	+	-	-	+
	1850	-	+	+	+	-	-	-
OPD4	1450	-	-	-	-	-	-	+
	950	-	+	+	+	-	-	-
OPD5	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD6	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD7	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD8	950	-	+	-	-	-	+	-
OPD9	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD10	-	-	-	-	-	-	-	-

**CONCLUSÕES**

A produtividade em maternidade foi semelhante para ambas as raças. A produtividade média para ambas as raças foi de 31,3 lóparas desmamados/gaiola/ano.

As matrizes da raça Califórnia (CA) tiveram habilidade materna superior às da raça Nova Zelândia(NZ).

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGUILAR, J. C.; ROCA, T.; ALAEENASAB, M. Evaluacion tecnica por menorizada de los

parámetros productivos de maternidad y engorda de una explotación cunicola. **Boletín de Cunicultura**, Barcelona-España, v. 80, n. 18, p.56-55, 1995.

CARABAÑO, R. Sistema de producción de conejos em condiciones intensivas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. **Anais ...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. p.17-37.

- COLIN, M. La Cunicultura Sudamericana: Brasil. **Boletín de Cunicultura**, Barcelona-España, v. 81, n. 18, p. 73, 1995.
- FERREIRA, W. M. Produção de conejos em Brasil: Alguns parâmetros reprodutivos. **Lagomorpha**, v. 99, n. 21, p. 25, 1998.
- MENDEZ, J. B. **Estúdio de la composicion optima del pienso de conejas y su interacción com el ritmo de reproduccion**. 1984. 132f. Tesis (Doctoral) – UPM, Madrid, Espana
- MATEOS, G. & PIQUER, J. Diseño de programas alimenticios para conejos: aspectos teóricos y formulación práctica. **Boletín de Cunicultura**, Barcelona-España, v. 76, p. 132, 1994.
- PACKER, M. F.; PACKER, I. U.; BARDIN, D. Vigor híbrido na fase de crescimento de coelhos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 14., 1997, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997. p.157.
- POLASTRE, R. Melhoramento genético de coelhos para produção de carne. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 27, 1990, Campinas. **Anais ...** Campinas: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990. p.599-615.
- PONCE DE LEÓN, R.; GUZMÁN, G.; QUESADO, M. Reproductive performance of four rabbit breeds with concentrate: forage diets in the subtropics. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 7, 2000. Valencia. **Proceedings ...** Valencia, CD ROM, 2000.
- ROUVIER, R. Genetic of rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 2, 1980, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1980. p. 320-329.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**. Belo Horizonte-MG: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SCAPINELLO, C.; MARTIN, E. N.; FURLAN, A. C. *et al.* Comportamento de três raças de coelhos em cruzamentos dialélicos. I – Tamanhos, pesos e ganhos de peso das ninhadas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25, 1988a, Viçosa. **Anais ...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1988a. p.272
- SAS. **SAS Users guide: Statistics**. Version 6.12. [s.l.]: Institute. Inc. Carry., 1996.
- TORRES, C.; PLÁ, M. e GARCIA, F. Nível de resposta em tempo a um control de seguimiento sanitário en conejos. In: SYMPOSIUM DE CUNICULTURA, 11, 1986f, Ternel, Espana. **Anales ...** Teruel, Espana, 1986. p. 145-152.