

03-001 - ESTABLISHMENT OF A MICROMETHOD FOR GENOME CHARACTERIZATION OF *OPUNTIA Ficus-indica* BY RAPDs. Birgit Arnoldt-Schmitt; Luciana Coe Girão; Rômulo M. Llamoca-Zárate; Francisco A.P. Campos. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. E-mail: birgit@ufc.br

Genome characterization is considered to be a valuable tool in research on genetic diversity and the breeding capacity of *Opuntia ficus-indica*. Unfortunately, a high content of mucilage makes it difficult to isolate DNA from fresh material of this cactus species. Standard DNA extraction methods using SDS and potassium acetate gave reliable results in our lab for transgenic callus material and cell suspensions of *O. ficus-indica*, but these methods or established methods based on CTAB were not useful for fresh material, like cladodes of this cactus species. In the presentation we report on the establishment of a rapid and efficient micromethod for DNA extraction and subsequent RAPD analysis of *O. ficus-indica* plants. A modified protocol of the kit "Nucleon Phytopure" from Amersham Pharmacia Biotech was applied for 100 mg of the chlorenchyma from cladodes. Removal of mucilage was achieved by the resin provided in the kit and, if necessary, by additional use of 4 % PVP. The amount of DNA obtained was significantly higher than for existing methods, which use several grams of plant material. Up to 100 mg DNA of high molecular weight per g fresh weight were achieved. RAPD analyses was performed with 10 ng template DNA by applying a kit (Ready-to-go RAPD analysis beads, Amersham Pharmacia Biotech), which contains two polymerases and reduces the pipetting procedure to three steps. The method is being applied on a *O. ficus-indica* cultivar (Gigante), that we are using for studies on somatic embryogenesis and genetic transformation. The RAPD fingerprints obtained showed a very high repeatability of the results and homogeneity of our plant material. For the cactus community in general, availability of a micromethod for genome characterization is extremely important. Programs are just being initiated at international level to support the characterization of genetic diversity for *Opuntia* species in various countries.

03-002 - MARCADOR RAPD LIGADO AO GENE DE RESISTÊNCIA À BRUSONE NO SOMACLONE DA CULTIVAR DE ARROZ ARAGUAIA. Leila Garcês de Araújo; Anne Sitarama Prabhu; Pedro Antônio Arraes. Embrapa Arroz e Feijão, Laboratório de Biotecnologia. E-mail: leilag@cnpaf.embrapa.br.

Somaclones da cultivar Araguaia resistentes a *Pyricularia grisea* foram desenvolvidos a partir de panículas imaturas. O gene que controla a resistência ao patótipo IB-9 de *P. grisea* foi designado Pi-ar. A população F_2 do cruzamento da cultivar altamente suscetível LI-JIANG-XIN-TUAN-HEI-GU (LTH) e do somaclone resistente SC09 segregou para uma razão de 3:1, indicando que um par de genes dominantes controla a resistência, fato este confirmado através da segregação obtida no retrocruzamento. A técnica de RAPD foi usada para identificar marcadores ligados a este gene. O DNA dos dois parentais, a cultivar LTH e somaclone SC09 foram analisados utilizando primers ao acaso. De um total de 577 primers, 523 produziram produtos amplificados. Os bulks suscetíveis e resistentes da população F_2 do cruzamento entre a cultivar suscetível LTH e o somaclone resistente SC09 juntamente com o DNA dos dois parentais foram testados com 176 primers que diferenciaram o progenitor suscetível do resistente. Trinta e seis primers diferenciaram o bulk suscetível do resistente, bem como a cultivar LTH do somaclone SC09, entretanto, somente um primer,

OPK17 ('CCCAGCTGTG') encontrou-se ligado (5.1cM) próximo a região que contém o gene de resistência do somaclone.

03-003 - CONDICIONES PARA LA CARACTERIZACION MOLECULAR DE LINEAS ELITE DE MAIZ *Zea mays* L. Hilda Fernández y Arnoldo Bejarano. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) Apartado Postal 358. Maracay 2101. Estado Aragua. Venezuela. Teléfono-Fax: 043 471066 E Mail: hfergonza@telcel.net.ve

En Venezuela el maíz es considerado un cultivo estratégico dentro de las actuales políticas agrícolas, por su importancia dentro de la agricultura del país. Un componente importante para mejorar su productividad es disponer de información sobre su variabilidad genética. El objetivo de esta investigación fue evaluar en las condiciones experimentales de nuestro laboratorio la confiabilidad y reproducibilidad de los marcadores RAPDs en la caracterización molecular de un grupo de líneas elite del programa de Mejoramiento Genético de Maíz del CENIAP. Para ello se estandarizó el protocolo de extracción del ADN genómico de plántulas según metodologías descritas por Doyle y Doyle (1990) y Dellaporta *et al.* (1983), y su amplificación con el uso de iniciadores aleatorios o RAPDs, (Williams *et al.* 1990). Entre los componentes de la mezcla de reacción, la concentración de ADN fue la variable más crítica para establecer las condiciones óptimas de amplificación. Las mismas fueron obtenidas con 7ng de ADN, 3mM de Mg2+, 0,2 uM de iniciador, 200uM de dNTPs y 0,5 U de Taq polimerasa, en un volumen total de 25 ul de reacción, y con el programa de amplificación consistente en una fase inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C y 45 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 37°C, un minuto a 72°C y una fase final de extensión de 7 minutos a 72°C utilizando los decámetros de OPERON OPA02, OPA10, OPA07, OPA04, OPA01, OPA07, OPA09, OPB06, OPB07, OPF14, OPM04, OPM20. Bajo estas condiciones se amplificó el ADN con ocho de los doce iniciadores empleados, comprobándose la reproducibilidad de los patrones RAPDs obtenidos. Los iniciadores OPA07 y OPF14 originaron el mayor polimorfismo.

03-004 - ANÁLISIS MOLECULAR DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR RESISTENTES AL VIRUS DEL MOSAICO (SCMV). AY. Zambrano; M. Fuchs; J.R. Demey; V. González; Z. Gutiérrez; E. Díaz. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Laboratorio de Biotecnología. e-mail: azambra@reacciun.ve

La caña de azúcar es susceptible a numerosas enfermedades transmitidas por insectos, siendo las más importantes las virales, entre las cuales se encuentra el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV). Esta enfermedad causa serias pérdidas en la producción ya que produce enanismo y necrosis en tallos y hojas. A través de inducción de mutaciones utilizando la metodología desarrollada por Irvine *et al* (1991) se desarrollaron clones de caña de azúcar resistentes a SCMV. Tejido calloso del cultivar B6749 (susceptible a SCMV) fue irradiado con 2 Krads de rayos gamma. Las plántulas regeneradas fueron probadas para resistencia a la raza B de SCMV en umbráculo y los clones resistentes fueron transferidos al campo, donde después de ocho generaciones de propagación vegetativa se observa resistencia estable a la infección del virus, obteniéndose en ensayos comparativos entre un 84% y un 95% de plantas asintomáticas. Con el propósito de detectar cambios genéticos relacionados con la adquisición de la resistencia se usó la técnica de RAPD en quince clones resistentes y su material progenitor susceptible