

CITOMETRIA DE FLUXO,
CONTAGEM CROMOSSÔMICA E RAPD
NA IDENTIFICAÇÃO DE GENOMAS E
ESPÉCIES DE *ORYZA*.

Gláucia Salles Cortopassi Buso
Maria Isabel O. Penteado
Marisa T. Pozzobon
Andrea del P.S. Peñaloza
Paulo H. Rangel
Márcio Elias Ferreira



Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília, DF
2000

Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Boletim de Pesquisa N.º 10

Exemplares desta publicação podem ser solicitados a:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cliente

Parque Estação Biológica – PqEB – W/5 norte Final

CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: 0 (XX) 61 448-4768

Fax: 0(XX) 61 448-4700

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antonio Emídio Dias Feliciano da Silva

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Marisa de Góes

Rui Américo Mendes

Suplentes: Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Tratamento Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Iara P. Machado

Editoração Eletrônica: Rita de Cássia Sales Santana

Tiragem: 200 exemplares

BUSO, G.S.C.; PENTEADO, M.I.O.; POZZOBON, M.T.; PENALOZA, A. del P.S.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. **Citometria de Fluxo, Contagem Cromossômica e RAPD na identificação de genomas e espécies de *Oryza*.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 44p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 10).

ISSN 0102-0129

1. *Oryza* - citometria de fluxo 2. *Oryza* - identificação de genomas 3. *Oryza* - identificação de espécie I. PENTEADO, M.I.O. II. POZZOBON, M.T.; III. PENALOZA, A. del P.S. VI. RANGEL, P.H V. FERREIRA, M.E. VI. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. VII. Título. VIII. Série.

CDD 633.18

© Embrapa – 2000

APRESENTAÇÃO

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, há um quarto de século, realiza a coleta e conservação de plantas de interesse econômico atual ou potencial como base para o melhoramento genético.

O melhoramento genético convencional de espécies, de um modo geral, utiliza a variabilidade pré-existente na natureza para obter recombinações de interesse. Dentre as recombinações frequentemente perseguidas pelos geneticistas, identificam-se as que combinam produtividade com resistência a condições adversas de caráter biótico (resistência a doenças e insetos) e abióticas (resistência a seca e alumínio tóxico, por exemplo). Quando esta variabilidade é restrita, por força de características intrínsecas de determinadas espécies (entre elas o hábito de polinização), é possível induzi-la artificialmente de diversas formas. Com frequência, entretanto, estas características são encontradas em espécies silvestres próximas filogeneticamente das espécies cultivadas.

Este processo somente serve ao melhorista se a caracterização genética das espécies for satisfatoriamente realizada de sorte a definir, com segurança, a compatibilidade entre genomas das espécies silvestre e cultivadas. No passado este processo estava limitado à descrição fenotípica e botânica. Há algumas décadas, ao processo de caracterização foram incorporadas técnicas da citogenética que permitiram definir níveis de ploidia que agora se associam a vários métodos que utilizam marcadores moleculares.

A definição do nível de ploidia se realiza atualmente de forma expedita por citometria de fluxo que foi associada, neste trabalho ao RAPD para permitir, com sucesso, a identificação de genomas de quatro espécies de *Oryza*, sendo três tetraplóides, (*O. alta*, *O. grandiplumis* e *O. latifolia*) e uma diplóide (*O. glumaepatula*), corrigindo a classificação de cerca de 15% de acessos coletados e erroneamente classificados com base em caracteres morfológicos.

O trabalho, a par de constituir informação importante para o uso direto das espécies silvestres de arroz pelos geneticistas que atuam com esta cultura, é um passo no sentido da completa caracterização dos genomas das espécies citadas, o que permitirá, no futuro realizar varreduras por técnica em uso na análise de genomas funcionais. A iniciativa abrirá caminho para a identificação de genes de interesse em espécies silvestres de arroz, que venham a ter potencial agrônomo e que poderão ser transferidos para espécies cultivadas por técnicas da engenharia genética já de domínio pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

LUIZ ANTONIO BARRETO DE CASTRO
Chefe Geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

SUMÁRIO

Resumo	07
Abstract.....	09
1. Introdução	11
2. Material e Métodos	14
3. Resultados e Discussão	16
4. Referências Bibliográficas	19
5. Anexos	22

CITOMETRIA DE FLUXO, CONTAGEM CROMOSSÔMICA E RAPD NA IDENTIFICAÇÃO DE GENOMAS E ESPÉCIES DE *Oryza*.

Gláucia Salles Cortopassi Buso¹

Maria Isabel O. Penteadó²

Mariza T. Pozzobon³

Andrea del P.S. Peñaloza⁴

Paulo H. Rangel⁵

Márcio Elias Ferreira⁶

RESUMO

O gênero *Oryza* contém aproximadamente 22 espécies, das quais 15 são diplóides e 7 tetraplóides. Na Amazônia e Pantanal brasileiros ocorrem três espécies tetraplóides de genoma CCDD (*O. alta*, *O. grandiglumis* e *O. latifolia*) e uma espécie diplóide de genoma AA (*O. glumaepatula*). As espécies silvestres de arroz possuem grande potencial de utilização em programas de melhoramento genético. São fontes de genes economicamente importantes como resistência a doenças e tolerância a estresses edafoclimáticos. A diversidade genética do arroz deve ser eficientemente conservada e caracterizada para uso presente e futuro. Recentes expedições de coleta de populações silvestres de arroz na Amazônia e Pantanal vêm permitindo estudar a variabilidade genética do arroz nativo do Brasil.

¹ Eng^a. Agr^a., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Eng^a. Agr^a., PhD, Embrapa Gado de Corte.

³ Eng^a. Agr^a., MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Eng^a. Agr^a., estudante de pós-graduação, UnB.

⁵ Eng^o. Agr^o., PhD, Embrapa Arroz e Feijão.

⁶ Eng^o. Agr^o., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O objetivo deste trabalho foi identificar a ploidia e o grupo genômico de 231 acessos de *Oryza* através do emprego de citometria de fluxo, contagem cromossômica e RAPD. A quantificação de DNA por citometria de fluxo foi baseada no uso de folhas tenras de cada acesso maceradas com tampão com fluorocromo, comparadas com padrão de DNA de *Oryza sativa*.

Na contagem cromossômica, pontas de raízes foram submetidas ao pré-tratamento de hidrólise, coradas pelo método de Feulgen e analisadas em microscópio ótico. Oito primers RAPD genoma-específicos, pré-selecionados, foram utilizados na identificação do genoma e espécie de cada acesso. As células de ponta de raiz exibiram consistentemente $2n=2x=24$ para espécies diplóides e $2n=4x=48$ para as tetraplóides. Os índices da citometria de fluxo variaram de 0,50 para *O. brachyantha* a 2,63 para *O. ridleyi*. O emprego da citometria de fluxo foi rápido e eficiente, corroborando os dados de contagem de cromossomos na verificação da ploidia dos acessos. Marcadores RAPD genoma-específicos foram consistentes na classificação dos acessos estudados. O uso combinado das três metodologias resultou na reclassificação de 15% de acessos, erroneamente classificados durante a coleta com base em caracteres morfológicos. O emprego conjunto de RAPD e citometria de fluxo na classificação de grande número de acessos recém coletados é uma forma rápida e eficiente de se iniciar o processo de caracterização genética de coleções de germoplasma.

Termos para indexação:

Oryza, RAPD, Citometria de Fluxo, Contagem Cromossômica, Caracterização Genética