

AMPLIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E MARCADORES MOLECULARES PARA LEITEIRO (*EUPHORBIA HETEROPHYLLA*) RESISTENTE A HERBICIDAS: UMA ABORDAGEM METODOLÓGICA

Rafael Romero Mendes¹; Hudson Kagueyama Takano⁵; Franck Dayan²; Todd Gaines²; Fernando Storniolo Adegas³; Rubem Silvério de Oliveira Jr⁴

¹Sumitomo Chemical Latin American. rafaromero.mendes@gmail.com; ²Colorado State University; ³Embrapa Soja; ⁴Universidade Estadual de Maringá; ⁵Corteva Agriscience

Destaque: A avaliação de primers e o desenvolvimento de marcadores moleculares auxiliam na investigação de mecanismos de resistência no sítio-alvo.

Resumo: Conhecer as metodologias aplicadas na biologia molecular é fundamental para o desenvolvimento de trabalhos sobre mecanismos de resistência a herbicidas, especialmente os relacionados ao sítio alvo. O objetivo deste trabalho foi demonstrar análises moleculares em sítios-alvo de herbicidas em leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) resistente a herbicidas. O trabalho consistiu na avaliação de *primers* e amplificação dos genes Protox I, Protox II, EPSPS e ALS, bem como no desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de mutações nos genes EPSPS e ALS. Sequências dos genes Protox de espécies da família das Euphorbiaceas disponíveis no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) foram alinhadas. Três pares de *primers* foram desenhados manualmente em regiões conservadas dos genes Protox I e Protox II dessas espécies. Foi necessário avaliar a combinação fatorial entre todos os *primers forward* e *reverse* para gerar a melhor amplificação para cada fragmento. Para os genes EPSPS e ALS, os *primers* foram criados a partir das sequências de leiteiro já disponíveis na plataforma de sequência genômica do *International Herbicide-Resistant Database* (NCBI). Todas as PCRs foram realizadas utilizando amostras de cDNA, a partir da extração de RNA e os fragmentos foram avaliados em gel de agarose. Após o sequenciamento de todos os fragmentos de interesse, *primers* com marcadores moleculares foram desenvolvidos para identificação das mutações Pro106Trp no gene EPSPS e Trp574Leu no gene ALS, por meio de ensaios de competição específica por alelos em PCR em tempo real. Com o trabalho, foi possível validar *primers* para a amplificação dos genes Protox I, Protox II, EPSPS e ALS. Os fragmentos sequenciados foram depositados no NCBI. Marcadores moleculares foram eficientes em distinguir alelos com (resistentes) e sem (suscetíveis) mutações nos genes EPSPS e ALS. Estes métodos servem de base para futuros trabalhos com essa e outras importantes espécies de plantas daninhas no Brasil.

Palavras-chave: Protoporfirinogênio-oxidase; Enol-piruvil-shiquimato-fosfato-sintase; Acetolactato-sintase; primers; resistência

Agradecimentos: A CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos

Instituição financiadora: Núcleo de Estudos Avançados em Ciência das Plantas Daninhas (NAPD), Fundação Eliseu Alves, Colorado State University