

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

Rafael Romero Mendes<sup>1</sup>; Hudson Kagueyama Takano<sup>5</sup>; Franck Dayan<sup>2</sup>; Todd Gaines<sup>2</sup>; Fernando Storniolo Adegas<sup>3</sup>; Rubem Silvério de Oliveira Jr<sup>4</sup>

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

**Destaque:** A avaliação de primers e o desenvolvimento de marcadores moleculares auxiliaram 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