**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização genética e foliar de capim-amargoso resistente ao herbicida
glyphosate e eficácia de seu controle com associação de herbicidas**

Arthur Arrobas Martins Barroso

**Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Fitotecnia**

**Piracicaba
2013**

Arthur Arrobas Martins Barroso
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização genética e foliar de capim-amargoso resistente ao herbicida glyphosate e
eficácia de seu controle com associação de herbicidas**

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO VICTORIA FILHO**

**Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Fitotecnia**

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Barroso, Arthur Arrobas Martins

Caracterização genética e foliar de capim-amargoso resistente ao herbicida glyphosate e eficácia de seu controle com associação de herbicidas / Arthur Arrobas Martins Barroso. - - Piracicaba, 2013.

95 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. *Digitaria insularis* 2. EPSPs 3. Absorção 4. Resistência I. Título

CDD 632.58
B277c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus, aos meus pais Maria do Carmo
e Fernando, irmã Amanda,
e avós, pelo apoio durante os anos.

DEDICO

Á namorada Júlia, pelo companheirismo
e ao meu pai Paulo (in memoriam),
pelos anos compartilhados.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- À Escola Superior de Agricultura” Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Victoria Filho, pelo apoio, dedicação e confiança ao longo dos anos.
- Aos professores Helaine Carrer e Francisco Tanaka, pela ajuda e sugestões na elaboração do trabalho.
- Aos amigos acadêmicos Alfredo, Fabrícia, Igor, Matheus, Wilton, Felipe, Filipe, João e Murilo, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração.
- Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal, pela ajuda nos experimentos, em especial aos funcionários Clayton, Aparecido e Luís.
- À Luciane, secretária do PPG em Fitotecnia, pela disponibilidade e ajuda.
- Aos funcionários do CEBTEC, em especial à Valentina Fátima e aos discentes Tarcísio Vasconcelos, Esteban Galeano e Flávio, pela ajuda e ensinamentos nos experimentos de biologia molecular, e aos funcionários da Cambuhy Agrícola pelo apoio nos estudos.
- À FAPESP, pela bolsa concedida na realização do trabalho.
- Ao professor Vitório Barato Neto, pela revisão e adequação da dissertação às novas normas da língua portuguesa.
- A todos os que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho e que por ventura, tenham sido esquecidos.

MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências.....	15
2 ANATOMIA FOLIAR DE CAPIM-AMARGOSO E SUA RELAÇÃO COM A SUSCETIBILIDADE AO GLYPHOSATE	19
Resumo.	19
Abstract.	19
2.1 Introdução	19
2.2 Material e métodos.....	21
2.3 Resultados e Discussão	24
2.4 Conclusões	33
Referências.....	33
3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>EPSP_s</i> EM BIÓTIPOS DE CAPIM-AMARGOSO	37
Resumo.	37
Abstract.	37
3.1 Introdução	37
3.2 Material e métodos.....	40
3.3 Resultados e Discussão	43
3.4 Conclusões	54
Referências.....	54
4 INTERAÇÃO ENTRE INIBIDORES DA ACCASE E GLYPHOSATE NO CONTROLE DE CAPIM-AMARGOSO.....	59
Resumo.	59
Abstract.....	
4.1 Introdução	59
4.2 Material e métodos.....	61
4.3 Resultados e Discussão	63
4.4 Conclusões	72
Referências.....	73
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
ANEXOS	77

RESUMO

Caracterização genética e foliar de capim-amargoso resistente ao herbicida glyphosate e eficácia de controle com associação de herbicidas

O capim-amargoso é uma planta daninha de difícil controle. Além de apresentar características de tolerância ao uso de herbicidas, como a presença de rizoma, e cera em sua superfície foliar, a espécie apresenta biótipos resistentes ao herbicida glyphosate. O glyphosate é o herbicida mais utilizado no mundo. Este trabalho objetivou avaliar as características foliares que contribuem para a absorção diferencial do herbicida glyphosate em biótipos resistentes de capim-amargoso. Para isso foram realizados estudos de microscopia eletrônica de luz e varredura em diferentes estádios vegetativos da planta. Em uma segunda parte, tratou-se da análise molecular de plantas resistentes, através da análise do sequenciamento e da expressão da enzima EPSPs. Foram ainda comparados diferentes biótipos quanto a sua similaridade na constituição enzimática. Por fim, analisou-se as alternativas de controle químico pelo estudo da associação de diferentes formulações de glyphosate com graminicidas. Estes trabalhos foram realizados em dois estádios vegetativos da espécie, sendo um estágio inicial e um estágio avançado (pré-florescimento). Como resultados, notou-se que as plantas suscetíveis apresentam características que facilitam a absorção do herbicida, como a presença de tricomas não cuticulados. A presença destes somada a espessa epiderme adaxial favorece a absorção no biótipo suscetível. Nos estudos enzimáticos, foram encontradas duas mutações de aminoácidos que compõe a enzima EPSPs. A expressão da enzima não foi conclusiva. O biótipo suscetível apresentou maior expressão da mesma. Esta expressão diferencial pode estar relacionada a uma maior eficiência da enzima em plantas resistentes. As plantas resistentes expressam os dois tipos de enzima, enquanto as suscetíveis apenas um. O uso de graminicidas em mistura com glyphosate é eficaz, porém o controle feito em estádios iniciais da planta é mais satisfatório. O uso de formulações de rápida absorção favorece o controle de plantas. O uso de quizalofop-ethyl foi superior aos demais graminicidas, não mostrando efeitos antagonísticos em associações com glyphosate. Recomenda-se que em estádios mais avançados das plantas, outras medidas, fora o controle químico sejam utilizadas, integradas em uma manejo integrado de plantas daninhas.

Palavras-chave: *Digitaria insularis*; EPSPs; Absorção; Resistência

ABSTRACT

Foliar and genetic characterization of glyphosate-resistant sourgrass and efficacy of herbicide association

The sourgrass is a hardy-to-kill weed. Besides characteristics of tolerance to herbicides, as the presence of rhizome and wax at leaf surface, there are present glyphosate-resistant biotypes. Glyphosate is the most used herbicide in the world. This study aimed to evaluate foliar characteristics that contribute to the differential absorption of the glyphosate in resistant biotypes of sourgrass. For this study has been performed scanning electron and scanning light microscopy at different vegetative stages of the plant. In a second part, it was analyzed the molecular biology of resistant plants EPSPs, through the sequencing and expression of the enzyme. Biotypes were also compared as their similarity in enzymatic constitution. Finally, were analyzed the chemical alternatives to control resistant sourgrass by studying the association of different glyphosate formulations with grass-herbicides. These studies were conducted in two stages of development of plants, one in early stage and other in advanced stage (before flowering). It was noted that susceptible plants have characteristics that facilitate the herbicide absorption, such as trichomes without wax. The presence of these plus the thick adaxial epidermis favors the absorption susceptible biotype. In enzymatic studies, were found two amino acids mutations at EPSPS gene composition. Expression of the enzyme was not conclusive. The susceptible biotype showed higher expression of it. This differential expression may be related to the increased efficiency of the enzyme in resistant plants. The resistant plants express two kinds of enzyme, while the sensitive biotype just one. The use of glyphosate in mixture with grass herbicides was effective, but the control is better in early stages of. The use of glyphosate formulations with rapid absorption enhances the control. The use of quizalofop - ethyl is better than the others herbicides tested, showing no antagonistic effects in association with any glyphosate formulation. It is recommended that at later stages of the plants development, others measures outside the chemical control should be used in an integrated management of weeds

Keywords: *Digitaria insularis*; EPSPs; Absorption; Resistance

1 INTRODUÇÃO

As culturas agrícolas estão sujeitas aos fatores ambientais de natureza biótica ou abiótica que direta ou indiretamente, influenciam não só em sua produtividade biológica, como também no sistema de produção empregado. Nos ecossistemas agrícolas, a presença de plantas daninhas condiciona diversos fatores bióticos atuantes sobre as plantas cultivadas, que vão interferir em seu crescimento, desenvolvimento e em sua produtividade. Esse efeito é denominado interferência (PITELLI, 1985). As plantas daninhas competem com as culturas por luz, água, espaço e nutrientes, além de interferir indiretamente, hospedando pragas e doenças, e interferindo em operações na lavoura, como a colheita da cultura e exercendo possível efeito alelopático (DURIGAN, 1988).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) possui desenvolvimento inicial lento, porém após 45 dias de germinado, suas raízes formam rizomas, que dificultam seu controle. Após este período, torna-se uma planta agressiva. Sua presença durante o cultivo de soja reduziu a produtividade desta em até 44% na presença de 6 a 8 plantas por metro quadrado (GAZZIERO et al., 2012).

No Brasil, esta espécie tem-se tornado uma planta daninha dominante em lavouras de café, pomares e em áreas de oleaginosas (LEMES et al., 2010; HEAP, 2013). Na citricultura, apresenta um grande inconveniente, pois sua parte subterrânea pode abrigar as bactérias do cancro cítrico (KISSMANN, 1997). É também problema em lavouras de algodão (AZEVEDO, 2003).

O capim-amargoso é uma planta daninha de ciclo fotossintético C4 (KISSMANN, 1997), cujo aproveitamento da luz solar e resposta fotossintética são maiores em condições ambientais de alta irradiância e temperatura elevada (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A espécie é caracterizada por plantas perenes, com reprodução por rizomas e sementes (KISSMANN, 1997). Apresenta alto potencial de infestação por conter pequenas sementes pilosas, que podem ser carregadas facilmente pelo vento a longas distâncias. É uma espécie fotoblástica negativa (MONDO, 2010). Desenvolve-se bem em solos com alta ou baixa fertilidade, reproduzindo-se o ano todo. Apresenta formação de rizomas após seu perfilhamento, formando touceiras que dificultam seu controle (CLAYTON et al., 2006; MACHADO et al., 2008).

Sua persistência no campo vem sendo elevada devido à seleção de plantas resistentes ao herbicida glyphosate (CARVALHO et al., 2011). O controle químico de plantas daninhas é

o método mais utilizado no mundo para o controle destas plantas. Segundo Duke e Powles (2008), o glyphosate é o herbicida mais utilizado, porém, sua aplicação repetida durante os últimos anos acabou selecionando diversas espécies com resistência a esta molécula.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, a sobreviverem e a se reproduzirem após sua exposição a doses de herbicidas que seriam letais a indivíduos normais (suscetíveis) da mesma espécie (WSSA, 1998).

Diversos são os mecanismos de resistência de plantas daninhas. São eles a alteração do sítio de ação do herbicida (o mais comum), o incremento da degradação metabólica do herbicida, o sequestro do herbicida, a superexpressão da enzima-alvo, a absorção reduzida do herbicida e a translocação reduzida deste. O aparecimento de plantas daninhas resistentes a herbicidas pode ocorrer devido ao seu uso inadequado (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

No controle químico, as folhas das plantas daninhas são a principal via de entrada do herbicida na planta, sendo que esta absorção é diretamente relacionada com a eficácia de controle da mesma. Sabe-se que as taxas de absorção foliar dependem, em grande parte, do tipo de estruturas encontradas nas folhas e da permeabilidade das cutículas (BAKER, 1982).

No capim-amargoso, diferenças nas estruturas foliares foram observadas para plantas originadas de sementes e de rebrotes, mas poucas informações foram levantadas com relação a biótipos suscetíveis e resistentes, o que necessita de estudos mais profundos (MACHADO et al., 2008). Esta diferença de constituição pode ser proveniente de uma adaptabilidade ecológica, o que influencia diretamente na resistência das plantas daninhas aos herbicidas (LAZAROTO et al., 2008).

Outro fator que relaciona a espécie de planta daninha com a resistência apresentada ao herbicida é sua diversidade genética, porque ela se desenvolve e evolui em um ambiente hostil. Quando existe grande diversidade genética, a seleção de indivíduos é favorecida, pois maior é a probabilidade de se encontrar alelo insensível ao produto utilizado (WINKLER et al., 2002).

Estudos já realizados encontraram no capim-amargoso alterações nos aminoácidos que compõem a enzima EPSPs nas posições 106 e 310 (CARVALHO et al., 2012). Porém faltam dados sobre a expressão e a atividade desta enzima, já que casos de superexpressão enzimática foram detectados como mecanismos de resistência em outras plantas (GAINES et al., 2010).

Diante deste problema, fica estabelecida a necessidade de controle destas plantas para evitar estes prejuízos no campo. Uma das formas de se prevenir e controlar a resistência de

plantas daninhas é através do uso de herbicidas aplicados em misturas, com diferentes ingredientes ativos e que, principalmente, apresentem mecanismos de ação distintos (POWLES; HOLTUM, 1994).

Existem trabalhos que avaliam o controle de capim-amargoso por misturas de herbicidas (CORREIA et al., 2010; TIMOSSI, 2009), porém em nenhum dos trabalhos buscou-se a utilização de índices que comprovem os efeitos destas misturas, como o realizado para outras espécies (KRUSE et al., 2001). Estes índices dão maior segurança à tomada de decisão em um manejo sustentável de uma população de plantas daninhas em um ecossistema.

Segundo Correia et al. (2010), os herbicidas inibidores da ACCase, em associação com o glyphosate, não se comportaram de maneira sinérgica, com exceção das maiores doses de sethoxydim. Tal fato pode estar envolvido com o sal presente na formulação do glyphosate ou do adjuvante usado na formulação de diferentes produtos. É necessário portanto conhecer o efeito destas associações sobre diferentes estádios vegetativos da planta para uma tomada de decisão segura.

Ressalta-se que para o controle de plantas de capim-amargoso assim como das outras plantas daninhas deve-se envolver medidas integradas de controle. Este conjunto de medidas é definido como Manejo Integrado de Plantas Daninhas, e, utiliza meios diferentes do uso de herbicidas, como medidas culturais (rotação de culturas, presença de cobertura do solo) e medidas preventivas (VICTORIA-FILHO, 2008).

Referências

AZEVEDO, D.M.P., CARVALHO, L. P., de PEREIRA, J. R., ARAÚJO, G. P., de BRANDÃO, Z. N., JERÔNIMO, J. R. Controle químico de plantas daninhas em algodoeiro herbáceo no cerrado mineiro. Campina Grande-PB. Embrapa, 2003. 3p. (Comunicado Técnico, 191)

BAKER, E.A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D.F.; ALVIN, K.L.; PRICE, C.E. (Ed.). **The plant cuticle**. London: Academic Press, 1982. p. 140-161.

CARVALHO, L.B., ALVES, P. L. C. A., GONZÁLEZ-TORRALVA, F., CRUZ-HIPOLITO, H.E., ROJANO-DELGADO, A.M., DE PRADO, R., GIL-HUMANES, J., BARRO, F., DE CASTRO, M. D. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n.2, p. 615-622, 2012.

CARVALHO, L.B., CRUZ-HIPOLITO, H., GONZÁLEZ-TORRALVA, F., ALVES, P. L. C. A., CHRISTOFFOLETI, P. J., DE PRADO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 2, p. 171–176, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P.J., VICTORIA FILHO, R., SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

CLAYTON, W.D. VORONTSOVA, M.S., HARMAN, K.T., WILLIAMSON, H. (2006). **Grass Base** - The Online World Grass Flora. Disponível em: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. Acesso em: 16 maio 2011.

CORREIA, N.M., LEITE, G.J., GARCIA, L.D. Resposta de diferentes populações de *Digitaria insularis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 4, p.769-776, 2010.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p. 319–325, 2008.

DURIGAN, J.C. **Controle químico de plantas daninhas na citricultura**. Jaboticabal: FUNEP/FCAV-UNESP, 1988. 18p.

GAINES, T.A., ZHANG, W., WANG, D., BUKUN, B., CHISHOLM, S.T., SHANE, D.L., NISSEN, S.J., PATZOLDT, W.L., TRANEL, P.J., CULPEPPER, A.S., GREY, T.L., WEBSTER, T.M., VENCILL, W.K., SAMMONS, R.D., JIANG, J., PRESTON, C., LEACH, J.E., WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.107, n.3, p.1029-1034, 2010.

GAZZZIERO, D.L.P., VOLL, e., FORNAROLLI, D., VARGAS, L., ADEGAS, F. S. Efeitos da convivência do capim-amargoso na produtividade da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 28, 2012, Campo Grande, **2012. Anais...** Campo Grande, 2012. p. 345-350.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide-R**, 2013. Disponível em: <http://www.weedscience.com/summary/home.aspx> Acesso em: 1º abr. 2013.

KISSMANN, K.G. *Digitaria insularis*. In: KISSMANN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**, v.1. São Paulo: BASF, 1997. p.510-513.

KRUSE, N.D., VIDAL, R.A., BAUMAN, T. T., TREZZI, M.M. Sinergismo potencial entre herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenoides. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 569-575, 2001.

LAZAROTO, C.A., FLECK, N.G., VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 3, p. 852-860, 2008.

LEMES, L.N., CARVALHO, L.B., SOUZA, M.C., ALVES, P.L.C.A. Weed interference on coffee fruit production during a four-year investigation after planting. **African Journal of Agricultural Research**, cidade, v.5, n.10, p.1138-1143, 2010.

MACHADO, A.F.L., MEIRA, R.M.S., FERREIRA, L.R., FERREIRA, F.A., TUFFI SANTOS, L. D., FIALHO, C.M.T., MACHADO, M.S. Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008.

MONDO, V.H.V., CARVALHO, S. J.P., DIAS, A.C.R., FILHO, J.M. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 1, p.131-137, 2010.

PITELLI, R.A. Interferências de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuária, Belo Horizonte**, v. 11, n. 129, p. 16-27, 1985.

POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 353p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TIMOSSI, P.C. Manejo de rebrotes de *Digitaria insularis* no plantio direto de milho. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n.1, p.175-179, 2009.

VICTORIA FILHO, R. Estratégias de manejo de plantas daninhas. In: ZAMBOLIM, L., ZUPPI, M., SANTIAGO, T. **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV, 2008. 464p.

WINKLER, L.M., VIDAL, R.A., BARBOSA NETO, J. F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 70, n. 4, p. 21- 24, 2002.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. **Weed Technology**. Champaign, v. 2, n.4, p.789-790, 1998. (Technology Notes)

2 ANATOMIA FOLIAR DE CAPIM-AMARGOSO E SUA RELAÇÃO COM A SUSCETIBILIDADE AO GLYPHOSATE

Resumo

O capim-amargoso exige altas doses de glyphosate para seu controle. Porém, do herbicida aplicado, pouco é absorvido. A boa absorção do herbicida é essencial para que ele atinja o sítio de ação. A pesquisa tratou do estudo de diferenças morfológicas e histológicas em folhas de biótipos resistentes e suscetíveis de amargoso, a fim de se buscar diferenças que pudessem explicar a suscetibilidade diferencial dos biótipos ao herbicida. Folhas de diferentes estádios fenológicos foram coletadas e submetidas a análises histológicas e de microscopia de varredura. Estas mesmas plantas foram submetidas à aplicação de glyphosate em doses crescentes. Os resultados sugerem que existem características foliares que influenciam na absorção e na translocação do glyphosate, tais como a menor espessura de parênquima e distância entre feixes vasculares no biótipo resistente. A morfologia diferencial é evidenciada nos maiores estádios vegetativos das plantas, principalmente pela presença de tricomas em maior número no biótipo suscetível, que resulta em uma absorção mais rápida do herbicida. O controle químico feito em estádios iniciais do crescimento é chave para um manejo adequado de *Digitaria insularis*.

Palavras-chave: *Digitaria insularis*; Resistência; Absorção

Abstract

The sourgrass is a weed that requires high rates of glyphosate to control. Little of the herbicide sprayed is absorbed. A good herbicide absorption is essential for its action, reaching the site of action. This study carried out to evaluate morphological and histological differences in leaves of glyphosate resistant and susceptible plants, in order to explain this different herbicide susceptibility. Leaves of different phenological stage of growth were collected and submitted to histological and scanning electron microscopy analysis. These plants were also submitted to a glyphosate whole-plant dose-response curve analysis. The results suggest foliar differences that can influence the uptake and translocation of glyphosate, as lower thickness of parenchyma and vascular bundles distance in resistant biotype. The different morphological structure is evident in the advanced morphological stage of the plant, mainly by the presence of more trichomes in susceptible biotype increasing the herbicide absorption. A chemical control in early phenological states is a key for proper weed management.

Keywords: *Digitaria insularis*; Resistance; Absorption

2.1 Introdução

Das plantas daninhas comumente encontradas em áreas agrícolas brasileiras, o capim-amargoso (*Digitaria insularis*), ocupa posição de destaque, sobretudo por exigir a aplicação de doses do herbicida glyphosate superiores às recomendadas para outras espécies da família Poaceae (CARVALHO et al., 2010). Segundo Timossi et al. (2006), a aplicação de 1.440 g

i.a. ha^{-1} de glyphosate promoveu um controle satisfatório da comunidade infestante, porém não evitou o rebrote do capim-amargoso.

O herbicida pode penetrar a planta através de suas estruturas aéreas (folhas, caules, flores) e subterrâneas (raízes, rizomas, etc.) Porém, a principal via de entrada do herbicida na planta é pela folha. É nela que se encontram estruturas que podem modificar a absorção de herbicidas, como, por exemplo, os tricomas. A relação negativa entre a presença de tricomas e a absorção de herbicidas é observada na maioria dos trabalhos (HESS; FALK, 1990).

A eficácia do glyphosate é dependente de processos como a retenção da molécula na superfície foliar, a penetração foliar, a translocação na planta até o sítio de ação e a inibição da enzima EPSPs, onde o produto vai exercer sua atividade (SATICHIVI et al., 2000).

A morfologia da folha altera a retenção, enquanto sua anatomia regula a velocidade de absorção do ativo (PROCÓPIO et al., 2003). Desta forma, a absorção diferencial do herbicida, pode afetar a sensibilidade da planta, pois aquele precisa estar no sítio de ação em concentração adequada (FERREIRA et al., 2006).

O estágio de desenvolvimento da planta pode também alterar a eficácia do herbicida, uma vez que ela tem diferentes prioridades para a condução dos seus fotoassimilados via floema, por onde o herbicida glyphosate se transloca (HETHERINGTON et al., 1998).

Segundo Machado et al. (2008), uma das dificuldades em controlar plantas de capim-amargoso, principalmente aquelas originadas de rizomas, está relacionada com a maior espessura na epiderme das faces adaxial e abaxial, e maior espessura da lâmina foliar, quando comparadas com plantas provenientes de sementes. Portanto, é recomendável que o controle desta espécie seja feito no início de seu desenvolvimento, em até 40 dias após sua germinação.

Em estudo sobre a absorção de glyphosate por diferentes acessos de plantas de capim-amargoso, encontrou-se que não existiam diferenças entre os ângulos de contato da calda do herbicida com a folha da planta daninha para biótipos resistentes e suscetíveis. Porém a absorção do ingrediente ativo foi mais lenta no biótipo resistente (CARVALHO et al., 2011). Em todos os biótipos testados, a absorção do ativo foi muito baixa, não ultrapassando 60 % do aplicado, mesmo após 4 dias. Segundo o autor, não se conhecem os mecanismos que afetam a absorção inicial do herbicida no biótipo resistente.

Segundo Galvani et al. (2012), as plantas de azevém apresentam diferenças foliares que podem contribuir com a sensibilidade ao glyphosate. A absorção foliar é um dos mecanismos da resistência ao glyphosate em *Sorghum halepense*, tanto por uma retenção foliar, quanto por uma menor velocidade de absorção (VILA-AIUB et al., 2011). A

diferenciação na absorção de herbicidas também é característica de plantas tolerantes (CRUZ-HIPOLITO et al., 2011).

Este trabalho teve por objetivo analisar a anatomia foliar de diferentes biótipos de capim-amargoso e relacionar esta anatomia com a suscetibilidade/resistência à aplicação do herbicida glyphosate em diferentes estádios vegetativos da planta.

2.2 Material e métodos

Sementes dos dois materiais (suposto resistente e suscetível, que serão designados a partir de agora como R e S) foram coletadas em campos de produção agrícola, em pomares citrícolas e áreas de horticultura. As sementes tiveram origem em Matão (SP) e Mogi das Cruzes (SP), respectivamente. Para confirmar a resistência, realizou-se uma curva de dose-resposta com a aplicação de doses crescentes de glyphosate.

As sementes foram postas para germinar em bandejas de poliestireno com 128 células, preenchidas com substrato hortícola PlantMax®. Quando as plântulas apresentavam duas a três folhas, foram transplantadas a vasos de 3 L, preenchidos com solo médio com as seguintes características: pH: 6,2; P: 5 mg/kg; K, Ca, Mg, H+Al, SB, T e V (%): 4,2; 41; 15; <26; 60,1; 72,5 mmolc/dm³ e 83%, respectivamente; e teores de argila, silte, areia total de: 276; 86 e 638 g/kg, respectivamente. As plantas destes vasos deram origem ao experimento de dose-resposta e aos experimentos de análise da anatomia e histologia foliar.

Quando apresentavam 4 folhas completamente expandidas, as plantas (3 por vaso) foram submetidas à aplicação de glyphosate em 7 diferentes doses, com 5 repetições. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. A aplicação ocorreu em uma câmara, regulada a distribuir 200 L.ha⁻¹ de calda, utilizando-se de uma pressão de 40 Psi e ponta do tipo jato em leque plano, 80.02.

As doses utilizadas de glyphosate foram: (0; 240; 480; 960; 1.920; 3.840 e 7.680 g e.a.ha⁻¹). Aos 7; 14 e 21 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos, avaliou-se o controle visual das plantas, por meio de escala que variou de 0 % (para ausência de controle) até 100 % (controle total), segundo escala proposta pela Sociedade Brasileira de Ciências das Plantas Daninhas (SBCDP, 1995).

Aos 21 DAA, a massa fresca da parte aérea das plantas foi avaliada e expressa em porcentagem de redução, comparando-se a testemunha. Uma vez verificada a diferença de controle entre os biótipos por análise estatística, os dados gerados foram analisados, utilizando-se de um modelo de regressão não linear pelo pacote drc (drc 1.2, Christian Ritz

and Jens Streibig, R.2.5, Kurt Hornik, online) no programa R (R statistical software, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.R-project.org>) (KNEZEVIC et al., 2007). As curvas de dose-resposta foram construídas utilizando uma regressão logística de 4 parâmetros (eq. 1):

$$Y = c + \left\{ \frac{d - c}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b} \right\} \quad (1)$$

Em que, **Y** é a redução de controle ou a redução de massa fresca; **c** é o limite inferior e **d** o limite superior do modelo; **b** é a declividade da curva; **e** é o valor de GR₅₀ (Dose para controlar ou reduzir a massa fresca em 50%). O cálculo do fator de resistência (FR) foi calculado com o valor de GR₅₀ do biótipo resistente, dividido pelo GR₅₀ do biótipo suscetível.

Uma vez conhecida a diferença de eficácia do glyphosate para os diferentes biótipos e comprovada a resistência, foram coletadas as folhas destas plantas a fim de submetê-las à análise histológica em microscopia eletrônica de luz e varredura. As análises de microscopia foram realizadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA - ESALQ/USP).

Para a análise histológica, a quarta folha de cada biótipo foi coletada e seccionada em sua região central, em tamanhos de aproximadamente 25 mm².

As amostras foram imediatamente fixadas em solução Karnovsky (1965) modificada (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001 M), em tubos Eppendorff de 1,5 ml, por 24 horas e mantidas em geladeira. Para melhor fixação, as amostras foram submetidas ao vácuo, para a retirada do ar contido nos espaços intercelulares.

Decorrido este período, as amostras foram desidratadas em série de etanol, em soluções de concentração crescentes (30; 50; 70; 90 e 100%), permanecendo 10 minutos em cada uma, sendo este processo repetido três vezes na solução de 100 %. Em seguida, as amostras foram infiltradas e polimerizadas em resina acrílica metacrilato Technovit. Os blocos com as amostras foram cortados em seções transversais, utilizando-se de micrótomo rotatório manual com navalha de aço do tipo 'C', sendo os cortes de 10 µm de espessura.

Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,05 %), pH 2,6 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981-modificado). Após isso, confeccionaram-se lâminas histológicas com

resina sintética (Entellan®). As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (Carl Zeiss Axioskop 2), sendo as imagens capturadas com câmera acoplada (MRc) através do programa Axiovision.

Os parâmetros avaliados foram: espessura da lâmina foliar, espessura da epiderme da face adaxial, abaxial e do parênquima clorofiliano. Foram também observadas a distância entre feixes vasculares e a relação entre o xilema e o floema.

Cada variável foi observada 30 vezes em 30 secções diferentes para ser submetida a análise de variância. Foram feitos 6 cortes por tratamento, resultante da observação de, pelo menos, 4 lâminas originadas de 4 plantas diferentes.

Para análise de microscopia eletrônica de varredura, foram coletadas a quarta folha de cada biótipo, folhas pré-inflorescência (6ª folha) e a quarta folha originada de rebrotes das plantas. Para isso, esperou-se que as plantas dos vasos florescessem para se coletar a folha em estágio mais avançado no desenvolvimento da planta. Algumas plantas foram cortadas, forçando-se o rebrote para a coleta da quarta folha. Este procedimento foi realizado uma vez que se almejou verificar a presença de características estruturais nas folhas que podiam interferir na absorção do herbicida, diminuindo sua eficácia. Para cada estágio coletado, foram observadas as duas superfícies de cada biótipo (adaxial e abaxial).

Para cada biótipo, a folha foi coletada e seccionada em sua região central, em tamanhos de aproximadamente 30 mm². As amostras foram imediatamente fixadas em solução Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001 M), em tubos Eppendorff de 1,5 ml, por 24 horas, e mantidas em geladeira. Para melhor fixação, as amostras foram submetidas ao vácuo, para a retirada do ar contido nos espaços intercelulares, procedimento igual ao realizado para as amostras anteriores.

Decorrido este período, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona, com soluções de concentração crescentes (30; 50; 70; 90 e 100 %), permanecendo 10 minutos em cada uma, sendo este processo repetido três vezes na solução de 100 %. A seguir, as amostras foram colocadas em gaiolas individuais devidamente identificadas e levadas para o aparelho secador ao ponto crítico CPD 050 da Balzers, onde passaram pelo processo de secagem ao ponto crítico, usando o CO₂ como meio de secagem.

Uma vez secas, as amostras foram montadas em “stubs” contendo fita adesiva de carbono e levadas para o metalizador MED 010 da Balzers. Após estes processos, as amostras foram levadas para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP, operando a 20 kV, onde as amostras foram avaliadas, e as melhores imagens, digitalizadas.

Analísaram-se as seguintes características para as superfícies adaxiais e abaxiais de cada biótipo: índice estomático, densidade estomática e densidade de tricomas. As análises do número de estômatos, células epidérmicas e tricomas deram-se em áreas de 0,05 mm², e para cada tratamento as observações foram repetidas 10 vezes. Os dados quantitativos foram posteriormente submetidos à análise de variância. O cálculo do índice estomático foi feito de acordo com a fórmula: Índice Estomático (IE) = NE / (CE + NE) *100, em que NE é o número de estômatos, e CE, o número de células epidérmicas (CUTTER, 1986).

2.3 Resultados e Discussão

Anteriormente à aplicação dos tratamentos, a câmara de pulverização passou por uma regulação de distribuição de calda. Observando-se a variação presente, chegou-se à conclusão de que, para uma distribuição de 200 L.ha⁻¹ de calda seriam necessários 40 Psi de pressão. A aplicação foi realizada, portanto, a 40 Psi, utilizando-se de volume de calda de 200 L.ha⁻¹ neste padrão determinado com ponta do tipo jato leque plano, 80.02.

Com as doses aplicadas, notou-se que aos 7 e 14 DAA (dias após a aplicação), os biótipos apresentavam diferenças de controle. Para o suscetível (S), a dose de maior efeito iniciava-se em 960 g e.a.ha⁻¹, enquanto para o resistente (R) esta dose foi de 3.840 g e.a.ha⁻¹. Aos 21 DAA, a dose de 240 g e.a.ha⁻¹ não teve efeito no biótipo R enquanto controlou 39% do biótipo S. A dose de 960 g e.a.ha⁻¹ do herbicida glyphosate controlou em mais de 95% o biótipo S, enquanto apenas a partir de 3.840 g e.a.ha⁻¹ controlaram-se mais de 80% do biótipo R (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Controle visual de dois biótipos de *Digitaria insularis* (capim-amargoso) aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos diferentes tratamentos. Piracicaba, 2013

Glyphosate g i.a.ha ⁻¹	Controle visual (%) após a aplicação					
	7 DAA ¹		14 DAA		21 DAA	
	S ²	R ²	S	R	S	R
0	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 e
240	38 c	1 d	39 c	1 d	39 c	1 e
480	62 b	16 c	74 b	53 c	75 b	55 d
960	73 ab	46 b	96 a	63 bc	97 a	65 c
1.920	75 ab	53 b	99 a	72 b	99 a	72 c
3.840	73 ab	73 a	100 a	88 a	100 a	88 b
7.680	78 a	76 a	100 a	98 a	100 a	98 a
DMS	13,39	12,21	8,94	11,07	8,32	9,27
F	91,6**	140,3**	381,2**	252,2**	393,2**	363,2**
CV	11,72	16,1	6,16	10,31	6,06	8,52

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem, significativamente, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. ¹Dias após a aplicação, ²Biótipo suscetível (S) e resistente (R), ** Significativo ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste F.

Com estas diferenças significativas, realizou-se uma regressão para se calcular o fator de resistência entre estes biótipos.

Para a regressão, utilizaram-se os dados de biomassa fresca coletados aos 21 DAA, sendo que a curva se mostrou adequada para os dados ($p < 0,05$). Com os parâmetros calculados, chegou-se a um valor de 2,36 para o fator de resistência (FR), comparando-se os valores de GR₅₀ dos dois biótipos. Isso indica que o biótipo resistente de capim-amargoso exigiu uma dose 2,36 vezes superior à dose exigida para redução de 50% da biomassa fresca do biótipo suscetível (Figura 2.1). Estes dados corroboram outros observados para a espécie, que variam entre 0,50 e 5,6 (CORREIA et al., 2010; CARVALHO et al., 2011).

Uma vez conhecida a resistência e a suscetibilidade diferencial entre as plantas ao herbicida glyphosate, foram analisadas as características de anatomia foliar dos biótipos.

Figura 2.1 - Redução de massa fresca de capim-amargoso aos 21 DAA, para os diferentes biótipos, em diferentes doses de glyphosate.

Das características analisadas, a espessura das superfícies adaxial e abaxial da epiderme e a espessura do parênquima das folhas mostraram-se semelhante para ambos os biótipos. A superfície adaxial obteve valores médios de 41 μm , enquanto a abaxial, em torno de 15 μm . Assim, afirma-se que estas características não tiveram efeitos na absorção diferencial de glyphosate. Outra característica semelhante entre as plantas foi a espessura da lâmina foliar. As características que se mostraram diferentes, encontram-se na tabela seguinte (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Valores médios de distância entre feixes vasculares e relação xilema/floema de biótipos de capim-amargoso.

Biótipo	Distância feixes vasculares (μm)	Relação xilema/floema
Resistente	1.16,50 b	2,32 a
Suscetível	1.30,27 a	2,05 b
F	9,31 **	8,42 **
DMS ¹	9,05	0,19
CV ²	13,69	10,23

Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem, significativamente, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. ¹Diferença mínima significativa, ²Coeficiente de variação.

Segundo Taiz e Zeiger (2013), folhas com nervuras mais próximas, neste caso as plantas resistentes (Figura 2.2), tendem a ter uma resistência hidráulica menor e maiores taxas fotossintéticas. Portanto, este biótipo pode apresentar maior translocação de fotoassimilados, maior distribuição de água (SAGE, 2004) e herbicidas, o que pode contribuir para a translocação do herbicida no biótipo resistente, diferente do observado por outros autores (CARVALHO et al., 2012).

Por outro lado a relação xilema/floema maior no biótipo resistente evidenciou um floema e um xilema de maior área em comparação com o biótipo suscetível. Como se sabe, o glyphosate transloca-se via floema e, portanto, sua translocação deverá ser maior no biótipo resistente. Ressalta-se ainda que a maior contribuição para este índice se deu pelo tamanho do xilema maior no biótipo resistente.

Sendo assim, estas características não devem afetar de maneira significativa a translocação de glyphosate nas plantas, pois outros autores encontraram que um dos mecanismos de resistência em capim-amargoso foi a não translocação do herbicida no biótipo resistente. Outros fatores podem estar envolvidos, como a metabolização do herbicida ou um processo de sequestro do herbicida.

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura, notou-se que a quantidade de estômatos foi maior na superfície abaxial da folha, mas que a planta possui estômatos em ambas as faces (folhas anfiestomáticas), igual ao identificado por outros estudos (MACHADO et al., 2006).

Figura 2.2 – Seções transversais do limbo foliar de capim-amargoso. 1 e 3 (Biótipo resistente); 2 e 4 (Biótipo suscetível); Ed, Eb: epiderme adaxial e abaxial respectivamente, Fv: feixe vascular, D: mesofilo, Bf: bainha do feixe, $\bar{=}$ 100 μ m

As células-guarda dos estômatos apresentaram-se em forma de halteres com células interestomatais de extremidades ligeiramente côncavas, com estômatos localizados em fileiras ao longo das nervuras (Figura 2.3), característico de algumas gramíneas. O estômato, assim como a superfície foliar apresentaram grande quantidade de deposição de cera epicuticular, em ambos os biótipos.

A deposição de cera pode estar relacionada com a menor absorção do herbicida pela espécie. Trabalhos relatam que a absorção estomatal dificilmente contribui com a entrada do herbicida na folha, que só ocorre com grandes pressões aplicadas (FROESCHEL; CHAMPMAN, 1951). A importância destes na absorção de herbicidas está relacionada com a presença de poros aquosos que ocorrem na cutícula, preferencialmente na base de estômatos e

de tricomas. Estes poros aquosos são cruciais para a penetração foliar de produtos químicos (SCHÖNHERR, 2006).

Figura 2.3 - Microscopia eletrônica de varredura da epiderme foliar de capim-amargoso. 1 (Superfície adaxial do biótipo resistente); 2 (Superfície adaxial do biótipo suscetível); 3 (Estômato do biótipo resistente); 4 (Estômato do biótipo suscetível); /=100 μ m

O índice estomático não variou na superfície adaxial de acordo com o estágio de crescimento da planta ou com o biótipo avaliado. Para a superfície abaxial, notou-se que a quantidade de estômatos por área foi maior nas folhas em estádios mais desenvolvidos de crescimento para o biótipo suscetível. O biótipo resistente, apresentou uma queda na quantidade de estômatos quando a folha foi originada de rebrote, enquanto o resistente manteve tal índice (Tabela 2.3).

Notou-se uma diminuição no número de estômatos por área em folhas originadas de rebrote na superfície adaxial para o biótipo resistente. Para a superfície abaxial, a densidade estomática elevou-se com o desenvolvimento da planta. Comparando-se os biótipos, a presença de estômatos foi maior nas plantas mais desenvolvidas do biótipo suscetível, em maiores estádios de desenvolvimento.

Apesar destas diferenças, sabe-se que a absorção de herbicidas via estômatos é muito reduzida e que, para ocorrer, depende do uso de surfactantes (SCHÖNHERR, 2006). A presença de tricomas influencia muito mais a retenção e consequente absorção do produto.

Figura 2.4 - Microscopia eletrônica de varredura da epiderme foliar de capim-amargoso. 1 (Superfície biótipo resistente V4); 2(Superfície biótipo suscetível V4); 3 (Superfície biótipo resistente V6); 4 (Superfície biótipo suscetível V6)); /=100 μ m

Comparando-se a presença de tricomas nos biótipos, nota-se que o desenvolvimento das folhas de plantas de amargoso traz consigo maior densidade de tricomas. Este fato pode ser observado para ambos os biótipos, em ambas as superfícies foliares (Tabela 2.3). Nos diferentes biótipos, observou-se que a superfície abaxial do suscetível apresentou muito mais tricomas que a do biótipo resistente no estágio V6. A ausência de tricomas em plantas resistentes, em estádios iniciais de desenvolvimento, reforça o conceito da aplicação em estádios iniciais.

Mesmo em baixa densidade (média de 14 por mm²), a presença destes tricomas indica que a retenção/absorção do herbicida na planta de amargoso, em estádios mais avançados de desenvolvimento pode ser dificultada, evidenciando que um manejo no estágio adequado de controle (plântulas) é essencial (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Valores médios de índice estomático, densidade estomática e densidade de tricomas de biótipos de capim-amargoso em 3 diferentes estádios vegetativos

Biótipo	Índice Estomático (%)		Densidade Estomática (estômatos mm ⁻²)		Densidade de Tricomas (tricomas mm ⁻²)	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial ¹	Abaxial ¹
Sup. foliar						
S (V4)	14,9 a	19,5 c	64 a	126 c	4 ab	0 c
S (V6)	13,6 a	25,5 a	62 a	264 a	14 a	106 a
S (R)	15,5 a	20,9 bc	64 a	142 c	0 b	2 c
R (V4)	15 a	25,5 a	78 a	134 c	0 b	2 c
R (V6)	15,4 a	24,1 ab	66 a	180 b	14 a	38 b
R (R)	11,2 a	17,8 c	30 b	134 c	0 b	12 c
F	2,43 *	13,59 **	8,01 **	36,02 **	5,71 **	75,41 **
DMS ²	4,41	3,71	23,72	17,06	12,34	21,91
CV ³	23,44	12,66	29,62	36,78	1,05	15,06

Médias seguidas por diferentes letras, diferentes na coluna, diferem significativamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ¹ Dados transformados em raiz quadrada de $x + 20$, ²Diferença mínima significativa,

³Coefficiente de variação.

Por outro lado, a presença de mais tricomas em plantas suscetíveis na face abaxial da folha pode estar relacionada com a absorção diferencial encontrada por outros autores (CARVALHO et al., 2012). A presença de tricomas sem a presença de cera, emergindo de células epidérmicas cobertas com grandes quantidades de cera, somada a espessura da epiderme adaxial, pode maximizar a velocidade e quantidade de absorção do herbicida glyphosate no biótipo suscetível pela sua superfície abaxial (Figura 2.5).

Segundo Schott et al. (1991), a superfície adaxial foi menos molhável e reteve menos calda em sua superfície do que a superfície abaxial em plantas de Italian ryegrass (*Lolium*

multiflorum). Ainda, segundo os autores, nesta espécie, dois terços da calda foram retidos nas superfícies abaxiais de folhas. Outro fator a se considerar em gramíneas, é o de que quando uma nova folha se desenvolve, a folha anterior pode se retorcer, expondo a superfície abaxial ao produto aplicado. Esta absorção diferencial também foi notada por outros autores (MICHETTE et al., 2007) em plantas de *Lolium multiflorum* e podem ser responsáveis por uma absorção diferencial do herbicida em plantas de capim-amargoso.

Figura 2.5 Microscopia eletrônica de varredura da epiderme foliar de capim-amargoso. 1 (Tricoma planta resistente); 2 (Tricoma planta suscetível); /=100µm

A absorção é influenciada também pela presença de estômatos e tricomas em plantas cultivadas, como por exemplo plantas de cana-de-açúcar, que apresentam maior fitotoxicidade a herbicidas decorrente da maior presença destas estruturas (FERREIRA et al. 2007). A entrada de soluções via tricomas já foi demonstrada há muito tempo (BENZING & BURT, 1970) e mesmo que ocorra com baixa frequência, esta rota de absorção se torna importante à planta de amargoso, notando-se que esta espécie absorve menos da metade do glyphosate aplicado após 96 horas (CARVALHO et al., 2012).

A queda no número de tricomas em folhas originadas de rebrote, somadas à menor presença de estômato, evidencia que medidas de manejo, como a utilização de uma roçadora anterior à aplicação do herbicida, poderiam ser uma ferramenta importante no manejo da

resistência, em casos em que as plantas estejam em maior estágio vegetativo. Porém esta prática depende do herbicida a ser utilizado. Existem trabalhos que mostram que essa roçagem não possui efeito prático na aplicação do glyphosate, indicando outros mecanismos de resistência predominantes (MELO et al., 2011). Outros trabalhos ressaltam esta técnica como medida viável na aplicação de graminicidas (FORNAROLLI et al., 2011).

2.4 Conclusões

Conclui-se que existem características anatômicas nas folhas de capim-amargoso que podem influenciar na absorção e na translocação do glyphosate, porém não são as principais causadoras da resistência. As diferenças morfológicas são evidenciada nos maiores estádios vegetativos das plantas, em ambos os biótipos, principalmente pela presença de tricomas e pela deposição de cera nas folhas. A planta suscetível apresenta mais tricomas em sua superfície abaxial que podem ser via de entrada do glyphosate. Com estes resultados, conclui-se que um controle químico feito em estágio inicial de desenvolvimento é essencial para um manejo adequado de *Digitaria insularis*.

Referências

- BENZING, D.H.; BURT, K.M. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. Bull. Torrey Bot. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, n. 97, p.269–279, 1970.
- CARVALHO, L.B., ALVES, P. L. C. A., GONZÁLEZ-TORRALVA, F., CRUZ-HIPOLITO, H.E., ROJANO-DELGADO, A.M., DE PRADO, R., GIL-HUMANES, J., BARRO, F., DE CASTRO, M. D. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n.2, p. 615-622, 2012.
- CARVALHO, L.B., CRUZ-HIPOLITO, H., GONZÁLEZ-TORRALVA, F., ALVES, P. L. C. A., CHRISTOFFOLETI, P. J., DE PRADO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 2, p. 171–176, 2011.
- CARVALHO, S.J.P., DIAS, A.C.R., SHIOMI, G.M., CHRISTOFFOLETI, P.J. Adição simultânea de sulfato de amônio e ureia a calda de pulverização do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 3, p.575 – 584, 2010.
- CORREIA, N.M., LEITE, G. J., GARCIA, L.D. Resposta de diferentes populações de *Digitaria insularis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 4, p.769-776, 2010.

CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. Pt 1: Células e tecidos. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. 304p.

CRUZ-HIPOLITO, H. citar todos et al. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. **Plant Soil**, Dordrecht, n.347, p. 221-230, 2011.

FERREIRA, E.A., VENTRELLA, M.C., SANTOS, J.B., BARBOSA, M.H.P., SILVA, A.A., PROCÓPIO, S.O., SILVA, E.A.M. Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2007.

FERREIRA, E.A., SANTOS, J.B., SILVA, A.A., OLIVEIRA, J.A., VARGAS, L. Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 365-370, 2006.

FORNAROLLI, D.A., GAZZIERO, D.L.P., BONOTTO, A.T., DOS SANTOS, B.C., DEBASTIANI, R., BANDEIRA, S.A.E. Manejo de biótipos de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glifosato. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE: USO SUSTENTÁVEL, 3. 2011.. **Anais...** Botucatu:FEPAF, p.317-320, 2011.

FROESCHEL, P.; CHAMPMAN, P. A new method of measuring the size of the stomatal apertures. **Cellule**, Louvain, n. 54, p.233-250, 1951.

GALVAN, J. RIZZARDI, M.A., CARNEIRO, C.M., BIANCHI, M.A. Anatomia foliar de *Lolium multiflorum* sensível e resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.30, n.2, p. 407-413, 2012.

HESS, F.D.; FALK, R.H. Herbicide deposition on leaf surfaces. **Weed Science**, Champaign, v. 38, n. 3, p. 280-288, 1990.

HETHERINGTON, P., REYNOLDS, T.L., MARSHALL, G., KIRKWOOD, R.C. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **Journal of Experimental Botany**, cidade, v. 50, n. 339, p. 1567-1576, 1998.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, Oxford, v. 27, p. 137-138, 1965.

KNEZEVIC, S. Z., STREIBIG, J. C., RITZ, C. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. **Weed Technology**, Champaign, v. 21, p. 840 – 848, 2007.

MACHADO, A.F.L., MEIRA, R.M.S., FERREIRA, L.R., FERREIRA, F.A., TUFFI SANTOS, L.D., FIALHO, C.M.T., MACHADO, M.S. Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008.

MACHADO, A.F.L FERREIRA, L.R., FERREIRA, F.A., FIALHO, C.M.T., TUFFI SANTOS, L.D., MACHADO, M.S. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 641-647, 2006.

MELO, M.S.C., VASSSIOS, J.D., NICOLAI, M., NISSEN, S.J., CHRISTOFFOLETI, P.J., BANZATO, T.C. Curva dose-resposta para *Digitaria insularis* resistente e suscetível ao

glyphosate após simulação de roçagem. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE: Uso Sustentável, 3., 2011.local. **Anais...** Botucatu: FEPAF, 2011. p.324-329.

MELO, M.S.C., BANZATO, T.C.B., NICOLAI, M., CHRISTOFFOLETI, P.J. Avaliação do crescimento dos biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente e suscetível ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27.,2010 Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FEPAF, 2010. p.1187-1190.

MICHITTE, P., DE PRADO, R., ESPINOZA, N., SANTAELLA, J.P.R., GAUVRIT, C. Mechanisms of resistance to glyphosate in a Ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. **Weed Science**, Champaign, n.55, p.435-440, 2007.

PROCÓPIO, S.O., FERREIRA, E.A., SILVA, E.A.M., SILVA, A.A., RUFINO, R.J.N., SANTOS, J.B. Estudos anatômicos de folhas de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. III. *Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*. **Planta Daninha**, Viçosa , v. 21, n. 1, p. 1-9, 2003.

SAGE, R.F. The evolution of C photosynthesis. **New Phytologist**, Oxford, v.4, n. 161, p. 341-370, 2004.

SATICHIVI, N.M., LOYD, M.W., STOLLET, E.W., BROSKIN, D.P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethy sulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, Champaign, , v. 48, p. 675-679, 2000.

SBCPD. Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. **Procedimentos param instalação, Avaliação e Análise de Experimentos com herbicidas**. Londrina-PR, SBCPD, 1995. 42p.

SCHÖNHERR, J. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, n.11, p.2471-2491, 2006.

SCHOTT, J.J., DUFOUR, J.L., GAUVRIT, C. Effects of adjuvants on herbicidal action. III – Effects of petroleum and rapeseed oils on diclofopmethyl action on ryegrass. **Agronomie**, Paris , n.11, p.27–34, 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TIMOSSI, P.C., DURIGAN, J.C., LEITE, G.J. Eficácia de glyphosate em plantas de cobertura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 475-480, 2006.

VILA-AIUB, M.M., BALBI, M.C., DISTÉFANO, A.J., FERNÁNDEZ, L., HOPP, E., YU, Q., POWLES, S.B. Glyphosate resistance in prennial *Sorghum halepense*, endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. **Pest Management Science**, Sussex, v.68, p. 430-436, 2011.

3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *EPSPs* EM BIÓTIPOS DE CAPIM-AMARGOSO

Resumo

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um fenômeno natural que ocorre nas populações. O herbicida atua como agente selecionador de indivíduos. No Brasil, recentemente, detectou-se a resistência de *Digitaria insularis* ao glyphosate. Existem diversos mecanismos de resistência de plantas daninhas, sendo eles regulados na maioria das vezes por alterações genéticas no sítio de ação do herbicida. Neste estudo, foram analisados o DNA genômico e o RNA de diferentes biótipos de capim-amargoso e sua relação com a suscetibilidade ao herbicida glyphosate. Foram analisados a similaridade do gene *EPSPs*, mutações de bases nitrogenadas e expressão gênica de diferentes plantas. Nota-se que as plantas diferem em sua composição enzimática conforme o distanciamento geográfico. Nas plantas resistentes ao herbicida glyphosate, ocorrem mutações duplas no gene *EPSPs*. Nas plantas resistentes, ocorrem dois alelos, sendo que a planta apresenta as duas formas enzimáticas, o que a torna não totalmente insensível ao efeito do herbicida. A expressão da enzima parece ser influenciada por estas mutações ou pela expressão destes diferentes alelos, porém os mecanismos que explicam o fato precisam ser mais bem estudados.

Palavras-chave: *Digitaria insularis*; Resistência; Glifosato

Abstract

Weed herbicide resistance is a natural phenomenon that occurs in populations. The herbicide acts selecting the resistant plants. Brazil, recently discovery glyphosate resistance sourgrass. There are several mechanisms of resistance in weeds, regulated most of them by genetic alterations in herbicide site of action. In this study was analyzed the genomic DNA and RNA from different sourgrass biotypes and its relation with susceptibility to glyphosate. Were analyzed the *EPSPs* gene similarity, mutations in nitrogenous bases and gene expression of different plants. Was noted that plants differ in their enzyme composition according to geographical distance. Glyphosate resistant plants present double mutations in *EPSPs* gene. In resistant plants occurs two alleles, so two enzymes forms, making the plant not at all insensitive to herbicide. The enzyme expression seems to be influenced by these changes or these alleles expression but these mechanisms need to be better investigated.

Keywords: *Digitaria insularis*; Resistance; Glyphosate

3.1 Introdução

A agricultura passa por um processo de revolução. A evolução da engenharia genética tem possibilitado o progresso da segurança alimentar, o avanço da ciência, a compreensão de processos biológicos, assim como o desenvolvimento de culturas tolerantes aos mais diversos herbicidas. A adoção destas culturas é crescente e tem elevado a produtividade no País. Esta produtividade só não é maior, porque existem, entre outros problemas, a interferência das plantas daninhas (TEIXEIRA. 2000). Estas, quando presentes, em comum com a cultura de interesse, causam entre 20 e 30 % de prejuízo na produtividade da cultura (LORENZI, 2006).

A competição é a principal interferência direta das plantas daninhas e pode ocorrer por nutrientes minerais, luz, água e/ou espaço (PITELLI, 1987).

Dentre os métodos utilizados no controle destas plantas, destaca-se o uso de herbicidas, existindo no mundo mais de 200 ingredientes ativos registrados, com diversos mecanismos de ação conhecidos (WSSA, 2010). Destes, o mais utilizado é o herbicida glyphosate, um herbicida não seletivo, cujo mecanismo de ação é a inibição da enzima *EPSPs* (5 enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase). Este herbicida possui baixo custo, alta eficácia, amplo espectro de controle e baixo impacto ambiental (PRESTON; WAKELIN, 2008). Com isso, seu uso ao longo do tempo tornou-se exclusivo e repetitivo para muitas ocasiões, incrementando-se a partir do surgimento de culturas geneticamente modificadas e tolerantes ao glyphosate.

Decorrente deste uso, plantas daninhas resistentes a esta molécula foram selecionadas. Neste sentido, a resistência de plantas daninhas pode ser definida como a capacidade natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, de sobreviverem e reproduzirem--se após sua exposição a doses de herbicidas que seriam letais a indivíduos normais (suscetíveis) da mesma espécie (WSSA, 1998), sendo este um fenômeno natural que ocorre nas populações. O herbicida atua como agente selecionador de indivíduos (CHRISTOFFOLETI et al., 1994), e entre as causas da resistência, estão o uso contínuo da molécula (GRESSEL; SEGEL, 1990) e a utilização de doses acima ou abaixo das recomendadas (POWLES, 2011).

Desde o início da agricultura moderna, com o descobrimento de compostos orgânicos, a resistência foi estudada (SWITZER, 1957) e ainda hoje é um problema mundial, estando registrados no mundo mais de 210 casos de espécies resistentes (HEAP, 2013). O primeiro caso de resistência ao herbicida glyphosate foi detectado em 1996 (HEAP, 2013).

Mesmo com tanto tempo de uso, ainda podem surgir casos de resistência de plantas daninhas a este herbicida, pois ele apresenta baixo potencial de seleção de plantas (BRACAMONTE et al., 2001). Esta baixa seleção deve-se ao fato de que mutações na enzima *EPSPs*, que diminuem a sensibilidade ao herbicida glyphosate, diminuem também a afinidade da enzima com seu substrato (PEP). No Brasil, recentemente, detectou-se a resistência de *Digitaria insularis* a esta molécula (CARVALHO et al., 2011). Infelizmente, o capim-amargoso tornou-se um problema na agricultura do País, uma vez que sua presença em alta densidade pode causar perdas de produtividade e aumento nos custos da produção agrícola (GEMELLI et al., 2012).

Além do descrito anteriormente, existem diversos mecanismos de resistência de plantas daninhas, entre eles a perda da afinidade do herbicida pelo local de ação da enzima (devido à mutação de uma base nitrogenada), a metabolização ou desintoxicação do herbicida a substâncias menos tóxicas, a redução da concentração do herbicida (sequestro), a absorção foliar ou a translocação reduzida do herbicida no biótipo resistente (CHRISTOFFOLETI et al., 2008) ou, ainda, a superexpressão da enzima-alvo, mecanismo recém-descoberto em plantas daninhas (GAINES et al., 2010).

Dos mecanismos descobertos que envolvem a resistência de plantas ao herbicida glyphosate, todos os mecanismos supracitados foram encontrados como causadores da resistência de, pelo menos, uma espécie. A resistência ao herbicida pode ainda ser resultado da soma de mecanismos dentro de uma mesma planta (WANG et al., 2013; DINELLI et al., 2008).

Como causa da resistência ao glyphosate, foram encontradas mutações do gene *EPSPs*, que conferem resistência a plantas. Estas podem ocorrer na posição 106 da sequência de aminoácidos que a compõem. Assim, essa substituição troca a prolina por uma serina, que causa uma tolerância média de cinco vezes ao herbicida glyphosate (BAERSON et al., 2000). Outra forma de induzir essa resistência é através de uma mutação dupla. Deste modo, foram encontrados casos onde a mutação ocorre nas posições 101; 102 e/ou 106 do gene que codifica a enzima (DEGRYSE et al., 1997).

Para o capim-amargoso, essas mutações foram encontradas nas posições 182 e 310, trocando uma prolina por uma treonina, e uma tirosina por uma cisteína (CARVALHO, 2012). Ainda no amargoso, foram encontradas por este mesmo autor mecanismos de absorção, translocação e metabolização diferencial do herbicida.

Com relação a culturas transgênicas desenvolvidas que apresentem tolerância ao herbicida glyphosate, nenhuma delas utiliza a superexpressão do gene *EPSPs* em sua constituição. Este fato seria interessante, haja vista que alguns autores encontraram que esta superexpressão pode estar relacionada a uma vantagem adaptativa da planta, ou seja, uma melhoria de “fitness” (WANG et al., 2013). Este mecanismo já foi encontrado em plantas de *Conyza* spp. (DINELLI, 2006), *Amaranthus* (GAINES et al., 2010) e *Lolium* (SALAS et al., 2012).

Finalmente, o mecanismo desta superexpressão não está totalmente elucidado. Sugere-se que a presença de sequências duplas do gene *EPSPs* é responsável por essa amplificação (GAINES et al., 2013). Segundo os autores, sugere-se, ainda, a existência de dois loci para os genes da enzima *EPSPs*, sendo que estes podem conter diferentes alelos de expressão

enzimática. Este mecanismo não foi ainda identificado para plantas de capim-amargoso. Portanto, foi objetivo deste trabalho verificar estas mutações e seus efeitos na expressão diferencial da enzima.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material Vegetal e áreas de coleta

Este estudo analisou sequências de DNA (nível genômico) e cDNA (nível transcriptômico) de plantas de amargoso. Assim, foram coletadas sementes de quatro biótipos de plantas de diferentes localidades: (1) uma área com frequente aplicação do herbicida glyphosate (mais de 10 anos), em Matão-SP; (2) Mogi das Cruzes (área de horticultura sem aplicação do herbicida); (3) Jaboticabal, em terrenos onde o controle das plantas era feito através de roçagens; (4) em terrenos com aplicação de diferentes moléculas de herbicidas, na área experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –FCAV – UNESP.

Todas as sementes foram postas a germinar em bandejas de poliestireno de 128 células, preenchidas com substrato hortícola PlantMax®. Quando as plantas apresentavam bom desenvolvimento (antes do florescimento), foram submetidas à extração de DNA. Os estudos de biologia molecular foram realizados no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ – USP.

3.2.2 Extração de DNA e análise de sequencias ao nível genômico

O DNA de cinco plantas dos quatro biótipos foi extraído seguindo protocolo de CTAB modificado (DOYLE; DOYLE, 1987), anexo1. Posteriormente, o DNA foi quantificado em gel de agarose (1% v/v) junto com a qualidade. Para a amplificação do gene *EPSPS*, foi realizada PCR para cada extração, com as seguintes características: 1 µL de cada DNA (100 ng/µl); 5 µL de tampão green 5xGoTaq® (Promega, USA); 0,5 µL dNTPs 10mM; 1 µL de *primer* (10pmol/ µL) 1S *Forward* (5'-AGCTGTAGTCGTTGGCTGTC-3'); 1 µL de *primer* (10pmol/ µL) 1AS *Reverse* (5'-GCCAAGAAATAGCTCGCACT- 3'), 16,30 µL de água Milli-Q, e 0,2 µL de GoTaq® DNA polimerase (Promega, USA), completando o volume de 25 µL. A mistura da reação foi colocada em termociclador GeneAmp® System 9700 (Applied Biosystems®, USA) e submetida a 94 °C, por 5 minutos (desnaturação inicial); 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 45 segundos a 60 °C (anelamento) e 30 segundos a 72°C

(extensão); 72°C por 5 minutos (extensão final); e a 4°C, finalizando a reação da PCR. Os *primers* utilizados foram desenhados por Perez-Jones et al.(2007).

Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose como descrito previamente, e o fragmento foi purificado através do uso de sulfato de amônio (protocolo anexo 2), e logo os DNAs foram sequenciados no Abi Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). As sequências de DNA obtidas foram analisadas pela ferramenta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) / NCBI, com o intuito de avaliar a similaridade do gene *EPSPS* da planta *Digitaria* com genes de outras espécies, e a similaridade (ao nível de nucleotídeos) entre estas sequências (anexo 3) foi observada, utilizando-se do ClustalW, Ebi (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As sequências foram ainda traduzidas a aminoácidos (<http://web.expasy.org/translate/>) para logo avaliar a presença de domínios proteicos, e motivos ao nível proteico com o uso do programa PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

3.2.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de sequências ao nível transcriptômico

Para a análise do cDNA de plantas, primeiramente extraíram-se os RNAs de folhas dos diferentes biótipos (anexo 4). Para estas análises, foram selecionados os biótipos de Matão e Mogi das Cruzes, conhecidos anteriormente por apresentarem resistência e suscetibilidade ao herbicida glyphosate, respectivamente.

O RNA total foi extraído utilizando-se de 100 mg de tecido foliar pelo método de TRIzol® (Life Technologies, USA). O tecido foi rapidamente triturado em nitrogênio líquido e colocado em Eppendorffs de 1.5 µl. Uma vez extraídos, os RNAs foram quantificados, utilizando-se de um espectrofotômetro Nanodrop 200c (Thermo Scientific, USA), onde também foi verificada a qualidade da extração com a relação 260/280. Extrauiu-se duas vezes o RNA de cada planta, em 5 repetições (plantas) por biótipo.

Posteriormente, sintetizou-se o cDNA a partir do RNA, utilizando-se da enzima Transcriptase Reversa SuperScript III First-Strand Synthesis® (Life Technologies, USA), anexo 5, utilizando-se de 3µg do RNA total isolado anteriormente em combinação com oligo(dT)₂₀, de acordo com as instruções do fornecedor.

Primers desenhados anteriormente por Perez-Jones, citados anteriormente, foram utilizados para amplificar um fragmento de 564 pares de bases do gene *EPSPS* de *Digitaria insularis*. Cada PCR foi realizada em duplicata, utilizando-se do cDNA obtido. Utilizou-se de 5 µL de tampão White 5xGoTaq® (Promega, USA); 0,5 µL dNTP 10mM; 1 µL de *primer*

(10pmol/ μ L) 1S *Forward* (5'-AGCTGTAGTCGTTGGCTGTC-3'); 1 μ L de *primer* (10pmol/ μ L) 1AS *Reverse* (5'-GCCAAGAAATAGCTCGCACT-3'); 15,37 μ L de água Milli-Q; 0,13 μ L de GoTaq® DNA polimerase (Promega, USA), e 2 μ L de cDNA (100 ng/ μ L), completando o volume de 25 μ L. Em um segundo mix, no lugar dos primers para o gene *EPSPS*, utilizaram-se *primers* para Actina como controle positivo.

A mistura da reação foi colocada no termociclador GeneAmp® System 9700 (Applied Biosystems®, USA) e submetida a 94 °C, por 3 minutos (desnaturação inicial); 40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 45 segundos a 55 °C (anelamento) e 1 minutos a 72°C (extensão); 72°C por 20 minutos (extensão final); e a 4°C, finalizando a reação da PCR.

Este cDNA foi posteriormente quantificado e uma alíquota deste PCR corrido em gel de agarose a 1% (v/v). Depois deste procedimento, correu-se um gel de agarose, sendo as bandas de interesse purificadas com o QIAquick Gel extraction Kit® (QIAGEN, USA, seguindo as recomendações do fabricante (anexo 6), para sequenciamento no Abi Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Foram utilizadas 4 repetições para cada biótipo.

As amostras obtidas após o sequenciamento foram editadas no programa BioEdit (Ibis Biosciences, USA) para a montagem das sequências de nucleotídeos (anexo 7), e análise dos aminoácidos e domínios proteicos, como foi explicado previamente.

3.2.4 Análise da expressão do gene *EPSPS* em plantas resistentes e suscetíveis

Para análise da expressão do gene *EPSPs*, foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real, também chamada qRT-PCR. Para isso, foram desenhados primers específicos para esta metodologia e utilizado como gene-controle o gene da Actina.

O desenho dos novos *primers* (anexo 8), foi realizado, utilizando-se de um programa específico para a verificação da estabilidade dos primers – NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/q_Oligo/Oligo.jsp?PID=1), sendo conferida a qualidade de cada um (anexo 9 e 10). Como prova final, foi realizada para cada primer uma curva de diluição, que se apresentou satisfatória. Os primers para o gene *EPSPs* foram qepsF (5'-TAGTGGAGCGTTTTGGCGTGA-3'), qepsR (5'-GCATTTTATAGGGGACTTGTA-3') e os primers do gene de Actina foram actF (5'-ATATGGCTCACACCATCACC-3') e actR (5'-GAGGGAGAAGATGACCCAGAT-3').

A mistura de PCR em tempo real continha 5,0 mL de uma diluição de 1:80 dos diferentes cDNAs sintetizados para cada biótipo, os primers foram utilizados a uma concentração final de 50 mM cada um, 12,5 μ L do SYBR Green PCR Master Mix (Applied

Biosystems, USA) e finalmente foi completada a mistura para um volume final de 25 μ l. Assim, cada reação de gene *EPSPS* foi realizada em duplicata (réplica técnica). Também foram incluídos controles negativos para cada par de primer, utilizando-se de água em vez de cDNA. Os PCRs quantitativos foram realizados no StepOnePlus™ (Applied Biosystems, USA). Todas as reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: 2 min a 50°C; 2 min a 95°C, e 45 ciclos de 15 s a 95°C, e 1 min a 65°C em placas ópticas de 96 poços (Applied Biosystems, USA). As análises estatísticas e a comparação de médias foram realizadas pelo programa SAS ®Statistical Software.

3.3 Resultados e Discussão

Os biótipos serão designados, agora, como Matão (biótipo resistente), Mogi (biótipo suscetível), Capina (Jaboticabal, terreno sem aplicação do herbicida) e Unesp (local com variedade de aplicações de herbicidas).

A quantificação do DNA em gel foi realizada a fim de se verificar a eficácia na extração do DNA dos tecidos e a purificação da PCR (Figuras 3.1 e 3.2).

Figura 3.1 - Quantificação do DNA extraído de plantas de amargoso em gel de agarose (1% v/v). Piracicaba, 2013

Figura 3.2 -PCR purificado de amargoso em gel de agarose a ser submetido a sequenciamento. Piracicaba, 2013

A análise do DNA sequenciado dos quatro biótipos mostrou alta similaridade na constituição do gene *EPSPs*. A similaridade entre plantas de um mesmo acesso variou de 71,97% para as plantas de Mogi das Cruzes, a 95,03% para as plantas de Matão. Esta menor variação da sequência enzimática nas plantas resistentes pode estar relacionada com uma dominância da resistência das plantas, que, uma vez estabelecida, diminui a variação genética da planta.

Analisando a divisão em grupos segundo as sequências que determinam a formação da enzima das plantas, viu-se que existe clara divisão das plantas que apresentam suscetibilidade

ao herbicida glyphosate (Figura 3.3). Esta diferença pode estar relacionada, ainda, com a maior distância geográfica entre os acessos. As plantas originadas de Jaboticabal diferenciaram-se, também, das originadas de Matão (plantas resistentes).

Com relação à influência de diferentes meios de controle destas plantas, notou-se que mesmo que só capinadas (sem o uso do herbicida glyphosate), a semelhança das sequências foi alta. Nota-se, portanto, que a aplicação de glyphosate não criou uma resistência na população e, sim, apenas selecionou plantas que, em determinada localidade apresentaram insensibilidade ao produto, devido a uma estrutura genética diferenciada e que pode estar relacionada à subestruturação e à divergência evolutiva.

Figura 3.3 - Cladograma da quantificação da enzima EPSPs isolada a partir do DNA de capim-amargoso para diferentes biótipos. Piracicaba, 2013

Para se identificar a presença desta resistência de plantas ao herbicida glyphosate, as sequências de nucleotídeos foram traduzidas a aminoácidos no site ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>), escolhendo adequadamente o marco de leitura (ORF, do inglês Open Reading Frame), e os domínios foram avaliados pelo programa PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Pela análise das bases anteriormente identificadas como responsáveis pela conferência da resistência ao herbicida (182 e 310), notou-se que apenas o biótipo de Mogi das Cruzes se apresentou-se como suscetível, sendo os demais, plantas resistentes ao herbicida glyphosate, pela presença de uma dupla mutação na sequência codificante para a enzima *EPSPs* depois de realizar adequadamente as sequências-consenso.

Plantas resistentes:

NSESSCVELFLPLLGDAGTAMR**T**TA AVTAAGGNATYDLFMLATSGTSGLLIFFELQC
 AWGTENEGTNWRPGCRIETAGCGCLFPWHLPTS YGDRATRQGLPIPTCYILLCMIELL
 FRDNAFVNIRFLTLHGKITIVPNQQAIFCLSAKSYSAYVQLSYLLGCMLLNHELLIICY
 ALQVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLLMERFGVKAHSD
 SWDRF**C**GGQKYKLGFFFALLCFQYVPITDVPIL EHIKLLLAQIVSSSSVWGS LKAKQL
 AYYILHTDYDMAAHLIDWLDKKYLSSPALACMIVGTYYVERS

Plantas suscetíveis:

FISVRLFASLGCRM**P**LTAVTAAGGNATYLLFGLPWCLAYWGFLNFYVLEGPKEKPI
 LGRMKLGEGDWFLDWPPGIGIGRLPGYPHTFLGWVNSLFMLENLINFTWQNNLMSP
 PAAILCLSSSLLIHFLPPIWGMLLSSLLYVWSAAAVSGTARADDCCSSRERRCDHRI
 STYTCEHVS RAPDVQLLLHETTDTRTL SHGSATVHNHDDILHIMNANMITLTPDHLLD
 LFYDIQHTTLDHVTAYLL

Portanto, o surgimento destas diferenças no DNA não está relacionada com as práticas utilizadas no campo, e estas podem ter sido originadas de uma mutação ocasional ao longo do tempo. A distância geográfica entre os acessos pode ter impedido que os biótipos resistentes tenham-se disseminado a longas distâncias ou o cruzamento de plantas. Porém, o relato da resistência desta espécie em outros locais (HEAP, 2013) sugere que a prática adotada permite a seleção de plantas já existentes, elevando o número de indivíduos resistentes com a aplicação do herbicida, evolutivamente criando uma pressão de seleção que leva, finalmente, a divergências evolutivas e separações filogeográficas.

A existência da resistência em locais onde a aplicação não ocorre, sugere que o biótipo resistente pode apresentar vantagem adaptativa com relação ao biótipo suscetível ou que, no local, inexistia uma fonte de plantas suscetíveis ao herbicida. A resistência de plantas ao herbicida glyphosate comumente utilizado pode ter passado despercebida ao longo de um período de tempo devido à tolerância da espécie ao ativo glyphosate, pois a planta apresenta também características que dificultam seu controle, como a formação de rizomas.

A resistência pode ainda ser condicionada por genes de dominância incompleta, como ocorre nas espécies resistentes ao glyphosate (NG et al., 2004), e com isso a suscetibilidade de plantas dificilmente seria restabelecida na população mesmo que não ocorra mais a aplicação do herbicida.

O RNA das plantas foi extraído de maneira efetiva. As duas bandas superiores da Figura 3.4 designam o mRNA e o rRNA.

Figura 3.4 - Gel de agarose (1% v/v) originado da extração de RNA de plantas de capim-amargoso para dois diferentes biótipos. Piracicaba, 2013

Este RNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Scientific 200c, USA). A qualidade do RNA extraído pode ser observada pela relação de absorbância entre os comprimentos de onda 260/280 que deve ser próxima a 2.0 (Tabela 3.1). Um valor menor do que 2 indica contaminações com fenol ou trizol.

Tabela 3.1 - Valores de quantidade de RNA por μl e relação de absorbância de comprimentos de onda 260/280 para biótipos de capim-amargoso. Piracicaba, 2013

Amostra	RNA (ng/ μl)	Relação 260/280	Amostra	RNA (ng/ μl)	Relação 260/280
11_1	127,4	2,0	21_1	55,6	1,8
11_2	215,9	2,0	21_2	121,0	1,9
12_1	24,6	1,8	22_1	214,1	1,9
12_2	75,2	2,0	22_2	254,9	2,0
13_1	53,8	1,9	23_1	36,8	2,0
13_2	342,7	2,0	23_2	95,7	1,9
14_1	132,1	2,0	24_1	26,9	1,8
14_2	115,5	2,0	24_2	47,4	1,7
15_1	83,8	2,0	25_1	21,8	1,9
15_2	149,7	2,0	25_2	19,7	1,9

A partir destes dados, foi escolhido o RNA de quatro plantas por biótipo para síntese do cDNA, designadas a partir de agora de R para as plantas resistentes e S para as suscetíveis. A síntese do cDNA foi realizada, utilizando-se do kit SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogene, USA), seguindo as recomendações do fornecedor. O protocolo de extração encontra-se anexo. Este cDNA foi então quantificado no espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Scientific 200c, USA). Os resultados encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores de quantidade de cDNA por μl e relação de absorbância de comprimentos de onda de 260/280 para biótipos de capim-amargoso. Piracicaba, 2013

Amostra	cDNA($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Relação 260/280	Amostra	cDNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Relação 260/280
R1_1	1.157,8	1,77	S1_1	1.032,9	1,72
R1_2	1.181,6	1,77	S1_2	1.010,8	1,72
R2_1	1.039,2	1,77	S2_1	1.247,4	1,75
R2_2	998,2	1,75	S2_2	970,6	1,74
R3_1	1.041,9	1,78	S3_1	1.529,8	1,74
R3_2	1.015,3	1,76	S3_2	1081,2	1,74
R4_1	1.035,8	1,75	S4_1	924,5	1,72
R4_2	1.046,2	1,77	S4_2	1.100,9	1,75

Este cDNA foi submetido a uma reação de PCR para amplificação do gene *EPSPs*. O produto desta PCR foi corrido em gel de agarose (1% v/v), que se encontra na Figura 3.5. Este cDNA foi posteriormente purificado com Resina, kit Qiaex II Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) para o sequenciamento de bases. O protocolo desta purificação foi realizado seguindo o protocolo fornecido que se encontra anexo.

Figura 3.5 - Gel de agarose (1% v/v) originado da PCR do cDNA de plantas de capim-amargoso para dois diferentes biótipos. Piracicaba, 2013

Deste DNA purificado, uma alíquota foi submetida ao gel de Agarose (1% v/v) para verificar a presença de bandas específicas para os genes *EPSPS* e *Actina* (gene-controle).

Presente em quantidades suficientes (Figura 3.6) este material foi submetido a sequenciamento.

Figura 3.6 - Gel de agarose (1% v/v) originado da PCR do cDNA de plantas de capim-amargoso para dois diferentes biótipos. Piracicaba, 2013

A partir do sequenciamento, notou-se a presença de dois alelos governando a expressão do gene EPSPs (Figura 3.7), o que precisou da obtenção da sequência consenso de cada alelo, manualmente, com o programa Bioedit. Para as plantas suscetíveis, a edição deste sequenciamento, para os dois alelos, revelou apenas a formação de um tipo de proteína, a proteína suscetível ao herbicida. Porém, na planta resistente, notou-se a formação dos dois tipos de proteína, ou seja, dois alelos diferentes codificando na mesma planta.

Figura 3.7 - Sequenciamento da *EPSPs* de plantas de capim-amargoso mostrando os alelos e a necessidade de sequências-consenso. Piracicaba, 2013

Para as plantas suscetíveis, a leitura do sequenciamento produziu a seguinte sequência, semelhante para os dois alelos:

Alelo1:

FPIAVVVGCGGKASYDEEGQEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVP
 RMRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTDCPPVRIKGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSA
 LLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDSWDRFYKGGQKYK
 SPKNAYEI

Alelo2:

NAVVGCGGKFPVEKDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPR
 MRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTDCPPVCIKGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSA
 LMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDSWDRFYKGGQKYKS
 PKNAYEI

Já as plantas resistentes produziram duas sequências diferentes, uma para cada alelo:

Alelo1:

AVVVGCGGKSLDGEDAKREVQLFLGNAGTAMRTLTAAVTAAGGNATYVLDGVPR
MRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTDCPPVRIKIGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSAL
LMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDSWDRFCIKGGQKYKS
PKNAYE

Alelo2:

AVVVGCGGKFPVEKDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPR
MRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTDCPPVRIKIGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSAL
LMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDSWDRFYIKGGQKYKS
PKNAYE

Em resumo, na Tabela 3.3, podemos ver os resultados obtidos para as quatro plantas.

Tabela 3.3 - Resumo dos aminoácidos codificados pelas bases nitrogenadas presentes nos diferentes alelos, nas posições 182 e 310 do gene *EPSPs* para biótipos de capim-amargoso. Piracicaba, 2013

Resistente	Planta 1		Planta 2		Planta 3		Planta 4	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
BN 182	Prolina	Treonina	Prolina	Treonina	Prolina	Prolina	Prolina	Treonina
BN 310	Tirosina	Cisteína	Cisteína	Cisteína	Tirosina	Cisteína	Tirosina	Cisteína
Suscetível	Planta 1		Planta 2		Planta 3		Planta 4	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
BN 182	Prolina	Prolina	Prolina	Prolina	Prolina	Prolina	Prolina	Prolina
BN 310	Tirosina	Tirosina	Tirosina	Tirosina	Tirosina	Tirosina	Tirosina	Tirosina

Portanto, confirmou-se que a dupla mutação existe em espécies de capim-amargoso resistentes ao herbicida glyphosate. E que esta dupla mutação nem sempre está presente, podendo em algumas plantas estar presente apenas a mutação na base 310 (tirosina por cisteína). A mutação do gene *EPSPs* é responsável, na maioria dos casos, por diminuir a afinidade desta enzima com o glyphosate (herbicida). Recentemente, descobriu-se que a mutação não é no sítio ativo de ligação do herbicida e, sim, atua indiretamente no sítio de ligação. A mutação no *EPSPs* confere uma alteração da estrutura proteica, diminuindo a afinidade desta com o herbicida.

Haja vista que a mutação na segunda base ocorreu em todos os casos, sendo esta mutação escolhida para o desenho de primers a fim de se verificar a expressão do gene *EPSPs* nos diferentes biótipos, sem a aplicação do herbicida. Ainda para análise de PCR em tempo real, utilizou-se como gene-controle do gene da *Actina*, um gene que não varia sua expressão nas diferentes plantas. Esta invariação também foi testada e encontra-se anexa.

A qualidade dos primers quanto ao seu tamanho, porcentagens de Guanina e Citosina, formação de dímeros e Hairpins foi verificada. A diluição destes também foi testada anteriormente à execução da análise de expressão enzimática.

Como resultado da expressão do gene *EPSPs* em relação à expressão do gene *Actina*, o resultado obtido não é totalmente conclusivo. Quando se analisa esta expressão, utilizando duplicatas para cada planta de cada biótipo, a expressão do gene *EPSPs* é maior nos biótipos suscetíveis ao herbicida do que nos biótipos resistentes (Figura 3.8). Esta maior expressão é comprovada pela análise estatística com o programa SAS® (Tabela 3.4).

Figura 3.7 - Expressão da enzima *EPSPs* de plantas de capim-amargoso com relação ao gene *Actina*. Piracicaba, 2013

Tabela 3.4 - Expressão diferencial da enzima *EPSPs* para biótipos de capim-amargoso. Piracicaba, 2013

Expressão <i>EPSPs</i> A		Expressão <i>EPSPs</i> B
Resistente	1,81 a	1,81 a
Suscetível	3,01 b	3,01 a
CV ¹	39,86	28,80
F	6,21	5,94

¹Coeficiente de variação. Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. Programa SAS.

Porém, quando é realizada a média destas repetições, esta diferença de expressão deixa de ser significativa (Tabela 3.4).

Figura 3.8 - Expressão do gene *EPSPs* de plantas de capim-amargoso com relação ao gene *Actina*. Com a média das repetições. Programa Estatístico SAS. Piracicaba, 2013

Esperava-se que a expressão no biótipo resistente fosse igual à do biótipo suscetível ou que sua expressão fosse maior. A superexpressão do gene EPSPs sem a aplicação de glyphosate já foi verificada em outras espécies, como o caruru (GAINES et al., 2010). A elevação do mRNA codificante para EPSPs também foi verificada em espécies como *Lolium multiflorum* e *Conyza* spp. (BAERSON et al., 2002, DINELLI et al., 2008).

Quando ocorre a expressão diferencial de uma enzima, normalmente, a planta sofre um custo energético para isso. No capim-amargoso, um desenvolvimento mais rápido do biótipo resistente foi observado (MELO et al., 2010), em comparação com plantas suscetíveis, o que pode estar relacionado com esta expressão diferencial ou com outros mecanismos de resistência da planta, como a translocação do produto (CARVALHO et al., 2011).

Em mutações já relatadas em regiões conservadas do gene EPSPs (Prolina 106), a enzima deixa de ter afinidade com o glyphosate, porém continua funcional (afinidade por PEP). Esta mutação é importante e rara, pois a enzima com outras mutações pode deixar de ter afinidade com o glyphosate, porém também deixa de ter afinidade pelo substrato, impedindo a produção dos aminoácidos aromáticos (ESCHENBURG et al., 2002).

No presente estudo, a mutação dupla pode estar relacionada com a atividade diferencial da enzima, o que pode explicar a perda de afinidade pelo glyphosate sem a perda da afinidade pelo PEP.

A menor expressão pode estar ainda ligada à maior atividade da EPSPs codificada pelos genes da planta resistente. Maior atividade da enzima em plantas resistentes ainda não

foi observada na literatura e pode ser um dos mecanismos de resistência adotado pelas plantas. Precisa-se de mais análises genéticas para compreender de forma global a resistência da planta, ao nível genômico, transcriptômico e traducional (proteico).

Sendo assim trabalhos adicionais necessitam ser realizados para a elucidação dos efeitos causados pelas mutações enzimáticas em plantas resistentes, assim como seus efeitos no metabolismo e no desenvolvimento de plantas.

3.4 Conclusões

- a) Conclui-se que as plantas de capim-amargoso mais distantes geograficamente diferem em maior grau quanto sua composição enzimática (gene EPSPs) e que esta diferenciação não é modificada por influência da prática de controle de plantas daninhas utilizadas.
- b) Nas plantas resistentes ao herbicida glyphosate, ocorrem mutações duplas na sequência de aminoácidos que traduzem a enzima.
- c) Nas plantas resistentes, ocorrem dois alelos, sendo que a planta apresenta as duas formas enzimáticas, o que a torna não totalmente insensível ao efeito do herbicida.
- d) A expressão da enzima EPSPs parece ser influenciada por estas mutações ou pela expressão destes diferentes alelos, porém os mecanismos que explicam o fato precisam ser mais bem estudados. Sugere-se continuar os estudos moleculares nesta planta.

Referências

BAERSON, S.R., RODRIGUEZ, A.J., BIEST, N.A., TRAN, M., YOU, J., KREGER, R.W., DILL, G.M., PRATLEY, J.E., GRUYS, K.J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Champaign, n. 50, p.721–730, 2002.

BAERSON, S.R., TRAN, M., BRINKER, R. Characterization of a glyphosate-resistant *Eleusine indica* biotype from Malaysia. In: INTERNATIONAL WEED CONTROL CONGRESS, 3., 2000.local. **Proceedings...** Bangkok:Thailand 2000. p.150

BRACAMONTE, E.R. citar todos et al. Impacto de la soja (*Glycine max* (L.) Merr.) transgénica en el perfil productivo agrícola en Argentina. In: Prado, R. de ;X Jorrín, R. de (Ed.). Uso de herbicidas en la agricultura Del siglo XXI/ In:II SIMPOSIUM

INTERNACIONAL, 21., 2001. Córdoba, 2001. Proceedings... Córdoba: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 2001. p. 619-625.

CARVALHO, L.B., ALVES, P. L. C. A., GONZÁLEZ-TORRALVA, F., CRUZ-HIPOLITO, H.E., ROJANO-DELGADO, A.M., DE PRADO, R., GIL-HUMANES, J., BARRO, F., DE CASTRO, M. D. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n.2, p. 615-622, 2012.

CARVALHO, L.B., CRUZ-HIPOLITO, H., GONZÁLEZ-TORRALVA, F., ALVES, P. L. C. A., CHRISTOFFOLETI, P. J., DE PRADO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 2, p. 171–176, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P.J. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. São Paulo: HRAC-BR, 2008. 120p.

CHRISTOFFOLETI, P.J., VICTORIA FILHO, R., SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

DEGRYSE, E., FREYSSINET, G., LEBRUN, M., SAILLAND, A. Mutated 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene coding for this protein and transformed plants containing this gene. Patent no. WO 97/04103, 1997.

DINELLI, G., MAROTTI, I., BONETTI, A., CATIZONE, P., URBANO, J.M., BARNES, J. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**, Oxford, n. 48, p.257–265, 2008.

DINELLI, G., MAROTTI, I., BONETTI, A., MINELLI, M., CATIZONE, P., BARNES, J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, n. 86, p. 30–41, 2006.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedures for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, London, n.19, p.11-15, 1987.

ESCHENBURG, S. citar todos et al. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Planta**, Berlin, n.216, p.129-135, 2002.

GAINES, T.A. Identification of Genetic Elements Associated with *EPSPS* Gene Amplification. **Plos One**, n. 8, v.6, 2013.

GAINES, T., ZHANG, W., WANG, D., BUKUN, B., CHISHOLM, S.T., SHANE, A.L., NISSEN, S.J., PATZOLDT, W.L., TRANEL, P.J., CULPEPPER, A.S., GREY, T.L., WEBSTER, T.M., VENCILL, W.K., SAMMONS, R.D., JIANG, J., PRESTON, C., LEACH, J.E., WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, n.107, v. 3, p.1029-1034, 2010.

GEMELLI, A. OLIVEIRA JUNIOR, R. S., CONSTANTIN, J., BRAZ, G.B.P., JUMES, T.M.C., NETO, A.M.O., DAN, H.A., BIFFE, D.F. Biology aspects of *Digitaria insularis* resistant to glyphosate and implications for its control. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, n. 11, v.2, p.231-240, 2012.

GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. Modeling the effectiveness of herbicide rotations and mixtures as strategies to delay or preclude resistance. **Weed Technology**, Champaign, n.4, p. 186–198, 1990.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide-R**, 2013. Disponível em: <http://www.weedscience.com/summary/home.aspx> Acesso em: 1º abr. 2013.

LORENZI, H. **Manual de identificação de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 5.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2006. 339p.

MELO, M.S.C., BANZATO, T.C.B., NICOLAI, M., CHRISTOFFOLETI, P.J. Avaliação do crescimento dos biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente e suscetível ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010 Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FEPAF, 2010. p.1187-1190.

NG, C.H., RATNAM, W., SURIF, S., ISMAIL, B.S. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). **Weed Science**, Champaign, n.52, p.564– 570, 2004.

PEREZ-JONES, PARK, K.W., POLGE, N., COLQUHOUN, J., SMITH, C.A.M. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Berlin, n.226, p.395-404, 2007.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técn.** IPEF, v. 4, n. 12, p. 1-24, 1987.

POWLES, S.B., MANALIL, S., BUSI, R., RENTON, M. Rapid Evolution of Herbicide Resistance by Low Herbicide Dosages. **Weed Science**, Champaign, v.59, p. 210-217, 2011.

PRESTON, C.; WAKELIN, A. M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. **Pest Management Science**, Sussex, v.64, n.4, p.372-376, 2008.

SALAS, R.A., DAYAN, F.E., PAN, Z., WATSON, S.B., DICKSON, J.W., SCOTT, R.C., BURGOS, N.R. *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne ssp. multiflorum*) from Arkansas. **Pest Management Science**, Sussex, n.68, p.1223–1230, 2012.

SWITZER, C.M. The existence of 2,4-D-resistant strains of wild carrot. Proc. Northeast. **Weed Control Conference**, Nova Zelândia v.11, p.315–318, 1957.

TEIXEIRA, I.R., ANDRADE, M.J.B., CARVALHO, J.G., MORAIS, A.R., CORRÊA, J.B.D. Resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola) a diferentes densidades de semeadura e doses de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 399-408, 2000.

WANG, W., XIA, H., YANG, X., XU, T., SI, H.J., CAI, X.X., WANG, F., SU, J. SNOW, A.A., LU, B.R. A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase transgene for

glyphosate resistance stimulates growth and fecundity in weedy rice (*Oryza sativa*) without herbicide. **New Phytologist**, Cambridge, no prelo.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Common and chemical names approved by the Weed Science Society of America. **Weed Science**, Champaign, v.58, p.511–518, 2010.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Technology Notes. **Weed Technology**, Champaign, v. 2, n.4, p.789-790, 1998.

4 INTERAÇÃO ENTRE INIBIDORES DA ACCASE E GLYPHOSATE NO CONTROLE DE CAPIM-AMARGOSO

Resumo

O herbicida glyphosate é um herbicida não seletivo que inibe a produção de aminoácidos aromáticos essenciais à sobrevivência da planta. Este herbicida é disponibilizado no mercado em diferentes formulações que podem apresentar diferenças no controle de espécies. A mistura de herbicidas é uma ferramenta no controle de plantas daninhas resistentes, sendo uma opção a mistura de inibidores da ACCase ao herbicida glyphosate. Este trabalho contou com a aplicação de diferentes misturas de 4 graminicidas e 3 formulações de glyphosate em dois estádios vegetativos de plantas de capim-amargoso resistente ao herbicida glyphosate. O controle químico foi avaliado por notas visuais de controle aos 7; 14 e 28 dias após a aplicação e pela medida de biomassa fresca das plantas, aos 28 dias após a aplicação. As misturas foram avaliadas como antagonísticas, sinérgicas ou aditivas, segundo o modelo proposto por Colby. Dos tratamentos utilizados, conclui-se que todos são efetivos no manejo da resistência de *Digitaria insularis*, com exceção ao uso de glyphosate isolado, porém o controle deve ser feito em estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Em estádios mais desenvolvidos das plantas, outras medidas de controle além da associação de produtos devem ser tomadas.

Palavras-chave: Graminicídas; *Digitaria insularis*; Associação de herbicidas

Abstract

Glyphosate is a non-selective herbicide that inhibits the production of essential amino acids for plant survival. This herbicide is available in market in different formulations that can provide different weed control. The mixture of herbicides is a tool to control herbicide resistant weeds, with an option to mix ACCase inhibiting herbicide with glyphosate. This work carried out the application of different herbicides mixtures with grass herbicides mixed with 3 different glyphosate formulations in two sourgrass stages of development. Chemical control was evaluated in 7, 14 and 28 days after the application with a visual injury rate, and the fresh weight of the plants in 28 days after the application. The mixtures were classified as antagonistic, synergist or additive by Colby proposal. All the treatments were effective in sourgrass early control with the exception of isolated glyphosate. In late applications with more developed plants others control measures outside the herbicide mixture should be taken.

Keywords: Grass herbicides; *Digitaria insularis*; Herbicide association

4.1 Introdução

O herbicida glyphosate é um herbicida foliar de aplicação em pós-emergência não seletivo que pertence ao grupo dos inibidores da síntese de aminoácidos. Sua atuação dá-se inibindo a atividade enzimática da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (SHANER; BRIDGES, 2003). Esta inibição leva à não produção de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). Estes aminoácidos são essenciais para a produção da

parede celular, defesa da planta a patógenos e insetos, e produção de hormônios. Seus efeitos secundários ocorrem na respiração, fotossíntese e síntese proteica da planta (DUKE, 1990).

O glyphosate é o herbicida mais utilizado no mundo (HARTZLER, 2008). Seu uso elevou-se nos últimos anos devido à crescente adoção de culturas transgênicas tolerantes ao herbicida e à facilidade de seu uso, pois este apresenta baixa toxicidade, baixo custo, amplo espectro de controle e rápida adsorção no solo (VELINI et al., 2009). Com esse uso contínuo, plantas resistentes a esta molécula são selecionadas, o que aconteceu com a planta de capim-amargoso.

Além do glyphosate, o controle químico de capim-amargoso conta com poucas opções de herbicidas. O uso de herbicidas de contato, como o paraquat, é dificultado devido à formação de densas touceiras que impedem que o herbicida atinja a planta toda, que geralmente rebrota. Essa rebrota acontece muitas vezes, pois o herbicida não atinge o rizoma (MELO et al., 2010).

Sobram como opções os herbicidas recomendados que são sistêmicos, sendo eles os inibidores da ACCase, os inibidores da síntese de carotenoides e inibidores da EPSPs, o que restringe a variação de uso de herbicidas aplicados em pós-emergência. Destes, apenas o glyphosate é recomendado para uso em estádios avançados do desenvolvimento da planta (RODRIGUES; ALMEIDA, 2012). Portanto, é recomendável que o controle seja feito na fase inicial de desenvolvimento, quando a planta não apresenta muitos tricomas e não se encontra muito entouceirada.

Das soluções, algumas opções têm-se mostrado eficazes no controle, sendo que Adegas et al. (2010), utilizando os herbicidas clethodim, fluazifop-p-buthyl, tepraloxymid, haloxyfop-methyl e paraquat, obtiveram controles superiores a 90 %. Porém, quando a planta cresce, ela rebrota, e este controle cai para a média de 50% (PROCÓPIO et al., 2006), confirmando que o controle de plantas perenizadas é mais difícil (FORNAROLLI et al., 2011).

A associação do glyphosate com haloxyfop-methyl ou sethoxydim foi insatisfatória para um controle aceitável (CORREIA et al., 2010). Segundo Timossi (2009), um controle satisfatório é atingido pela aplicação isolada de nicosulfuron. Segundo Melo et al. (2012), o uso de misturas de glyphosate com graminicidas, como sethoxydim, haloxyfop-methyl, fluazifop-p-buthyl, fenoxaprop + clethodim e tepraloxymid, são alternativas viáveis. Este mesmo autor chegou à conclusão de que o uso isolado de clethodim é ineficiente no controle de plantas adultas.

Com relação ao herbicida glyphosate, estão disponibilizados no mercado diferentes formulações de glyphosate, que podem apresentar diferenças no controle de espécies, devido a fatos como absorção e translocação diferenciadas (MOLIN; HIRASE, 2005; LI et al., 2005). Estas formulações podem comportar-se de maneira diferente se associadas a diferentes herbicidas, entre eles os graminicidas.

Sendo assim, muitos são os resultados produzidos na associação de produtos, porém faltam índices que comprovem o efeito de interação de diferentes mecanismos de ação e o estudo do uso de diferentes sais de glyphosate (formulações), que podem apresentar comportamentos diferentes na planta. Uma maneira de predizer estes valores dá-se pelo uso da fórmula de Colby (COLBY, 1967).

A mistura é sinérgica quando seu efeito é superior à resposta prevista pelo efeito somado das aplicações isoladas de cada herbicida. É aditiva quando o efeito somado das aplicações isoladas é semelhante ao efeito esperado, e antagonística quando o efeito da mistura é menor do que o efeito somado das aplicações individuais (STAKER; OLIVER, 1998).

Outros trabalhos relatam que a mistura de glyphosate com outros herbicidas tem resultado em interações antagônicas e sinérgicas (LICH et al., 1997).

Este trabalho teve como objetivo de avaliar o efeito das misturas de diferentes sais de glyphosate associados a diferentes graminicidas no controle de plantas de capim-amargoso resistentes ao herbicida glyphosate, em diferentes estádios fenológicos, através do estabelecimento de relações sinérgicas, aditivas ou antagonísticas das misturas.

4.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, Brasil, no ano de 2012. Sementes de *Digitaria insularis* provenientes da fazenda Cambuhy, localizada em Matão-SP, foram coletadas em lotes onde a aplicação de glyphosate ocorreu em mais de 10 anos consecutivos. A resistência destas espécies foi comprovada em uma frequência de resistência de 2,36 vezes através de ensaios de dose-resposta ao herbicida glyphosate (Capítulo 2). As sementes foram originadas de, pelo menos, 40 diferentes plantas.

Estas sementes foram postas a germinar em vasos com capacidade de 3 litros, utilizando como substrato um solo médio com as seguintes características: pH: 6,2; P: 5

mg/kg; K, Ca, Mg, H+Al, SB, T e V (%): 4,2; 41; 15; <26; 60,1; 72,5 mmolc/dm³ e 83%, respectivamente; e teores de argila, silte, areia total de: 276; 86 e 638 g/kg, respectivamente.

Foram realizados dois experimentos de controle químico com as plantas originadas destas sementes. No primeiro, as aplicações ocorreram quando as plantas apresentavam 4 folhas, e no segundo, quando as plantas estavam em perfilhamento, com 3-4 perfilhos cada. O delineamento experimental utilizado em ambos foi o inteiramente casualizado, constituído de 20 tratamentos e seis repetições no primeiro experimento e 20 tratamentos e 4 repetições no segundo. Não foram necessárias aplicações de inseticidas, fungicidas ou adubações.

Para a aplicação dos tratamentos utilizou-se de uma câmara de aplicação experimental de herbicidas, acionada por um motor elétrico, com uma ponta de pulverização montada em bico leque jato plano modelo TeeJet 8002, pulverizando em média a 50 cm do alvo, com volume de calda de 200 L ha⁻¹ e pressão constante de 40 Psi. Os tratamentos utilizados podem ser verificados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Nome comum, dose em litro/quilograma do produto comercial por hectare e estágio de aplicação dos tratamentos com herbicidas nas plantas de capim-amargoso. Piracicaba, 2013

Tratamentos		Dose (L ou kg ha ⁻¹) 4 folhas		Dose (L ou kg ha ⁻¹) Perfilhos	
		Glyphosate	Graminicídas	Glyphosate	Graminicídas
Glyphosate Sal de isopropilamina +	-	2,0	0,0	3,0	0,00
	Quizalofop	2,0	0,5	3,0	0,50
	Haloxifop	2,0	0,5	3,0	0,50
	Sethoxydim	2,0	1,0	3,0	1,25
	Clethodim	2,0	0,4	3,0	0,45
Glyphosate Sal de amônio +	-	1,5	0,0	1,5	0,00
	Quizalofop	1,5	0,5	1,5	0,50
	Haloxifop	1,5	0,5	1,5	0,50
	Sethoxydim	1,5	1,0	1,5	1,25
	Clethodim	1,5	0,4	1,5	0,45
Glyphosate Sal potássico +	-	2,8	0,0	2,8	0,00
	Quizalofop	2,8	0,5	2,8	0,50
	Haloxifop	2,8	0,5	2,8	0,50
	Sethoxydim	2,8	1,0	2,8	1,25
	Clethodim	2,8	0,4	2,8	0,45
-	Quizalofop	0,0	0,5	0,0	0,50
-	Haloxifop	0,0	0,5	0,0	0,50
-	Sethoxydim	0,0	1,0	0,0	1,25
-	Clethodim	0,0	0,4	0,0	0,45
-	Testemunha	0,0	0,0	0,0	0,00

A avaliação da eficácia de controle proporcionada pela aplicação dos herbicidas deu-se através de escala visual de injúria das plantas, que varia de 0 a 100%, aos 7; 14 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA). 0% representou a ausência de sintomas, e 100%, a morte total da planta segundo o proposto pela Sociedade Brasileira da Ciência de Plantas Daninhas (SBCPD, 1995). Aos 28 DAA, foi medida a biomassa fresca da parte aérea das plantas.

Os dados obtidos aos 28 DAA foram analisados quanto às interações pelo modelo proposto por Colby. A equação utilizada para o cálculo da resposta esperada na interação foi (eq.2):

$$E = 100 - \frac{(100 - X) \times (100 - Y)}{100} \quad (2)$$

Em que, **E** é o controle ou redução de crescimento esperado pela mistura de herbicidas, **X** e **Y** representam a porcentagem de controle dos herbicidas aplicados isoladamente. A redução de biomassa fresca (**Rd**) das plantas daninhas foi calculada seguindo a equação (eq.3):

$$Rd = 100 - \frac{\text{Biomassa fresca da planta tratada}}{\text{Biomassa fresca da testemunha}} \times 100 \quad (3)$$

Em que, a biomassa fresca da testemunha foi a média dos valores obtidos na ausência da aplicação de herbicidas. Os valores calculados foram comparados com os valores observados por meio da análise de variância, com diferença mínima significativa avaliada ao nível de $p < 0,05$. Quando existiu a diferença entre as médias dos tratamentos, a associação de herbicidas foi designada de antagonística se o valor de controle resultante da mistura foi menor do que o valor esperado da soma das aplicações isoladas, e sinérgica se o valor da associação de produtos foi superior ao valor esperado da soma das aplicações isoladas. Quando não houve diferença significativa, a associação foi considerada aditiva.

4.3 Resultados e Discussão

Com relação ao controle químico proporcionado pelos herbicidas aplicados em estádios iniciais de desenvolvimento da planta, notou-se que todos os tratamentos foram

efetivos (> 80% controle), com exceção ao uso de glyphosate, no caso o uso do herbicida glyphosate sal potássico e sal de amônio. O uso de glyphosate sal de isopropilamina mostrou-se eficaz no controle, o que corrobora outros trabalhos (SILVA et al., 2011). Tal controle pode estar associado à presença da tecnologia Transorb® em sua formulação (MONSANTO, 2013). Outros trabalhos destacam a ação mais rápida desta formulação no controle de plantas daninhas (SILVA et al., 2011). Dos graminicidas, notou-se que o uso de clethodim mostrou maior variações nos dados quando aplicado isolado ou associado ao glyphosate sal de amônio (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Médias, máximo e mínimo dos controles observados (%) na aplicação dos tratamentos herbicidas em plantas de capim-amargoso, em estágio de 4 folhas. Piracicaba, 2013

Com relação à redução de biomassa fresca, os dados revelam que a aplicação em estádios iniciais de desenvolvimento das plantas (3-4 folhas) é fundamental no sucesso do

manejo da espécie. Mesmo com a aplicação de glyphosate, a redução desta massa ultrapassou valores de 90% (Figura 4.2).

Porém, como se tratou de um biótipo resistente, no final do período avaliado, próximo aos 28 dias após a aplicação (DAA), notaram-se que algumas plantas tratadas com glyphosate apresentavam rebrotas em sua base.

Figura 4.2 - Médias e erro-padrão da média para redução de biomassa fresca de plantas de amargoso decorrente da aplicação de herbicidas em comparação com a média da biomassa da testemunha não aplicada (%). Piracicaba, 2013

Uma vez observadas diferenças significativas entre os dados, estes foram submetidos a uma comparação de médias, por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Notou-se que aos 7 DAA (dias após a aplicação), o uso de qualquer herbicida contendo glyphosate apresentou o pior controle dos tratamentos. Na comparação entre eles, os piores foram glyphosate sal de amônio e sal potássico. Dos graminicidas testados, todos tiveram o mesmo efeito, assim como as misturas destes com glyphosate. A mistura de quizalofop ou clethodim ao herbicida glyphosate foi superior ao uso isolado de glyphosate, no

caso de glyphosate sal de isopropilamina, e todas as misturas superiores ao uso isolado de glyphosate sal de amônio e sal potássico (Tabela 4.2).

Aos 14 DAA, o pior controle resultou da aplicação de glyphosate sal de amônio e sal potássico. Dos graminicidas isolados, o uso de clethodim foi inferior ao uso de haloxyfop. Das misturas, todas foram mais efetivas que o uso de glyphosate isolado, exceto a mistura de glyphosate sal de isopropilamina e sethoxydim.

Aos 28 DAA, todos os tratamentos apresentaram resultados semelhantes estatisticamente, com exceção dos herbicidas glyphosate sal de amônio e sal potássico aplicados isoladamente, inferiores aos demais.

Na redução de biomassa fresca, o uso de glyphosate sal de isopropilamina foi superior ao uso das demais formulações de glyphosate. Os graminicidas tiveram efeitos semelhantes. As misturas de quizalofop foram superiores ao uso isolado de glyphosate sal potássico; as de haloxyfop, ao uso isolado de glyphosate sal de amônio e potássico; sethoxydim, ao uso isolado de glyphosate sal potássico, e clethodim, ao uso isolado de glyphosate sal de amônio e potássico. Tal fato ocorreu devido ao menor controle proporcionado pela aplicação de glyphosate sal potássico com relação ao glyphosate sal de amônio (Tabela 4.2).

Todas as misturas, assim como todos os graminicidas resultaram em efeitos semelhantes entre si e satisfatórios na redução da biomassa de plantas de amargoso (Tabela 4.2).

Como o controle alcançado pela aplicação de produtos isolados ou redução de biomassa fresca foi muito alto, seguindo a fórmula de Colby, o dividendo assumiu valores próximos ou iguais a 0; sendo assim, desde que o outro herbicida não prejudicasse esse alto valor atingido (o que não ocorreu neste caso), todos os tratamentos foram considerados aditivos (análise estatística resultante não significativa) e não serão apresentados.

Tabela 4.2 - Médias de controle visual de capim-amargoso aos 7; 14 e 28 dias após a aplicação (DAA) e porcentagem de redução de biomassa fresca em relação à testemunha, aos 28 DAA. Piracicaba, 2013

Tratamentos	Controle Visual (%)			Redução Biomassa Fresca (%)
	7 DAA	14 DAA	28 DAA	
Glyphosate ^A	58,3 bc	85,5 c	98,8 a	98,0 a
Glyphosate + Quizalofop	78,3 a	99,5 a	100,0 a	98,6 a
Glyphosate + Haloxyfop	75,0 ab	99,2 a	100,0 a	96,4 ab
Glyphosate + Sethoxydim	70,8 ab	93,7 abc	96,3 a	98,2 a
Glyphosate + Clethodim	80,0 a	99,3 a	100,0 a	98,1 a
Glyphosate ^B	32,5 d	65,0 d	68,3 b	91,3 bc
Glyphosate + Quizalofop	75,8 ab	99,3 a	100,0 a	95,6 ab
Glyphosate + Haloxyfop	76,7 a	99,0 a	100,0 a	97,8 a
Glyphosate + Sethoxydim	78,3 a	98,3 ab	100,0 a	96,7 ab
Glyphosate + Clethodim	74,2 ab	98,3 ab	91,7 a	97,2 a
Glyphosate ^C	46,7 cd	72,5 d	70,8 b	89,3 c
Glyphosate + Quizalofop	79,2 a	99,3 a	100,0 a	97,3 a
Glyphosate + Haloxyfop	73,3 ab	97,3 ab	100,0 a	95,7 ab
Glyphosate + Sethoxydim	72,5 ab	97,0 ab	100,0 a	96,6 ab
Glyphosate + Clethodim	75,8 ab	98,2 ab	99,7 a	97,3 a
Quizalofop	75,8 ab	98,0 ab	100,0 a	96,1 ab
Haloxyfop	76,7 a	99,2 a	100,0 a	97,1 a
Sethoxydim	70,8 ab	98,5 ab	99,2 a	96,6 ab
Clethodim	67,5 ab	88,8 bc	95,0 a	95,3 ab
DMS ¹	17,50	10,03	12,54	5,67
F	12,61 **	24,66 **	91,83 **	4,40 **
CV ²	11,92	5,11	6,55	2,82

¹Diferença mínima significativa; ²Coeficiente de variação; Adição de óleo mineral segundo recomendação do fabricante em todos os tratamentos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. ^A Sal de isopropilamina, ^B Sal de amônio, ^C Sal potássico.

Quando a aplicação dos herbicidas ocorreu em outro estágio da planta (planta perfilhando), o resultado de controle não foi o mesmo. Ressalta-se que os valores das doses foram corrigidos segundo informações do fabricante. O controle que sempre passava de 80 %, com exceção do glyphosate, em poucos casos ultrapassou este valor aos 28 DAA. Notou-se que com o uso de quaisquer dos sais de glyphosate, o controle foi sempre baixo. A mistura de herbicidas graminicidas melhorou, em todos os casos, o controle final atingido. O uso de graminicidas isoladamente também foi eficaz se comparado ao uso de glyphosate com exceção ao uso isolado de clethodim (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Médias, máximo e mínimo dos controles observados (%) na aplicação dos tratamentos herbicidas, em plantas de capim-amargoso, em estágio de 4 perfilhos. Piracicaba, 2013

Quando se analisou a redução de biomassa fresca, viu-se que novamente o uso de clethodim foi inferior aos demais graminicidas. Ele reduziu a massa das plantas daninhas em níveis iguais ou inferiores aos níveis de redução resultantes da aplicação de glyphosate, mesmo que em mistura com glyphosate sal potássico. Os melhores usos foram resultado da aplicação de quizalofop em mistura com glyphosate sal de isopropilamina ou isolado e a aplicação de haloxyfop isolado (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Médias e erro-padrão da média para redução de biomassa fresca de amargoso em comparação com a testemunha decorrente da aplicação de herbicidas no estágio de perfilhamento, avaliada aos 28 DAA. Piracicaba, 2013

Pela análise estatística, ao final do período avaliado, viu-se que o pior controle foi alcançado pelo tratamento com glyphosate sal de amônio e depois da aplicação de glyphosate sal de isopropilamina, sal potássico e clethodim isolado. Intermediários a estes valores, foram o uso de misturas de graminicidas com glyphosate e o uso dos outros graminicidas isolados.

O melhor resultado foi da aplicação de glyphosate sal de amônio juntamente com quizalofop (91,3% de controle), glyphosate sal potássico mais quizalofop (91,0%), quizalofop isolado (82,5 %) e clethodim em mistura com glyphosate sal de isopropilamina (81,3 %) ou sal de amônio (82,5%). A redução de biomassa resultou em valores muito próximos uns dos outros. A redução resultante da aplicação isolada de glyphosate ou da associação deste com

graminícidas foi semelhante. Dos graminícidas aplicados isoladamente, apenas o uso de haloxyfop foi superior ao uso de clethodim (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Médias de controle visual de amargoso aos 7; 14 e 28 dias após a aplicação (DAA) e porcentagem de redução de biomassa fresca em relação à testemunha, aos 28 DAA. Piracicaba, 2013

Tratamentos	Controle Visual (%)			Redução Biomassa Fresca (%)
	7 DAA	14 DAA	28 DAA	
Glyphosate ^A	31,3 bcde	46,3 e	47,7 d	63,7 abc
Glyphosate + Quizalofop	46,3 ab	70,0 abc	78,8 c	78,9 a
Glyphosate + Haloxyfop	27,5 de	63,8 bcd	76,3 c	69,0 abc
Glyphosate + Sethoxydim	40,0 abcd	75,0 abc	80,0 bc	71,0 abc
Glyphosate + Clethodim	47,5 a	78,8 ab	81,3 abc	68,1 abc
Glyphosate ^B	30,0 cde	50,0 de	35,0 e	65,1 abc
Glyphosate + Quizalofop	38,8 abcd	81,3 a	91,3 ab	73,2 abc
Glyphosate + Haloxyfop	38,8 abcd	77,5 ab	80,0 bc	74,1 abc
Glyphosate + Sethoxydim	40,0 abcd	72,5 abc	78,8 c	69,6 abc
Glyphosate + Clethodim	43,8 abc	65,0 bcd	82,5 abc	66,4 abc
Glyphosate ^C	40,0 abcd	61,3 cde	68,8 cd	56,4 c
Glyphosate + Quizalofop	41,3 abcd	76,3 abc	91,0 a	72,0 abc
Glyphosate + Haloxyfop	31,3 bcde	61,3 cde	76,3 c	64,6 abc
Glyphosate + Sethoxydim	36,3 abcde	68,8 abc	77,5 c	71,1 abc
Glyphosate + Clethodim	30,0 cde	68,8 abc	76,3 c	62,7 abc
Quizalofop	28,8 cde	68,8 abc	82,5 abc	76,4 ab
Haloxyfop	27,5 de	61,3 cde	78,8 c	79,6 a
Sethoxydim	30,0 cde	67,5 abc	75,0 c	63,1 abc
Clethodim	22,5 e	61,3 de	68,8 cd	60,5 bc
DMS ¹	15,31	15,62	13,51	18,04
F	22,21 **	9,37 **	57,49 **	3,24 *
CV ²	9,76	8,94	6,71	7,79

¹Diferença mínima significativa, ²Coefficiente de variação; Adição de óleo mineral segundo recomendação do fabricante em todos os tratamentos.

*, **Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5 e 10 %. ^A Sal de isopropilamina, ^BSal de amônio, ^CSal potássico.

Analisando os resultados segundo a fórmula de Colby e considerando os valores de controle e a redução de biomassa fresca, os resultados das misturas não foram tão efetivos quanto os que ocorreram da aplicação em estágio vegetativo inicial da espécie.

Quando se comparou o uso de glyphosate sal de isopropilamina com os graminícidas, os resultados são antagonísticos em todos os casos, com exceção do controle da mistura com clethodim, que foi aditiva. Porém tal fato pode ser explicado devido ao baixo controle proporcionado pela aplicação isolada do herbicida clethodim. Assim esperava-se que qualquer

efeito superior a este, até mesmo pelo uso de glyphosate, mostrado na Figura 4.4, fosse ser aditivo ao seu uso em mistura.

O herbicida glyphosate sal de amônio só apresentou efeitos antagonísticos quando em mistura com haloxyfop com relação ao controle visual, porém com todos os graminicidas quando foi avaliada a redução de biomassa fresca das plantas. Isto aconteceu porque o controle proporcionado pela mistura sempre foi muito próximo daquele obtido com o uso dos produtos isolados, e algumas vezes até inferior.

O herbicida glyphosate sal de potássico agiu de maneira aditiva em mistura com quizalofop em relação ao controle visual e em mistura com sethoxydim na redução de biomassa fresca. As outras associações foram antagonísticas.

Tabela 4.4 - Médias de controle visual e porcentagem de redução de biomassa fresca de amargoso aos 28 dias após a aplicação (DAA) e relações entre misturas. Piracicaba, 2013

Tratamentos	Controle Visual (%) 28 DAA	E	Interação	Redução Biomassa Fresca (%)	E	Interação
Glyphosate ^A	53,8 d	-		63,7 abc	-	
Glyphosate + Quizalofop	78,8 c	92,0 **	An	78,9 a	91,4 *	An
Glyphosate + Haloxyfop	76,3 c	90,3 **	An	69,0 abc	92,7 **	An
Glyphosate + Sethoxydim	80,0 bc	88,5 *	An	71,0 abc	86,2 *	An
Glyphosate + Clethodim	81,3 abc	87,5 NS	Ad	68,1 abc	85,5 **	An
Glyphosate ^B	35,0 e	-		65,1 abc		
Glyphosate + Quizalofop	91,3 ab	88,8 NS	Ad	73,2 abc	91,9 **	An
Glyphosate + Haloxyfop	80,0 bc	86,3 **	An	74,1 abc	92,8 **	An
Glyphosate + Sethoxydim	78,8 c	84,0 NS	Ad	69,6 abc	87,2 **	An
Glyphosate + Clethodim	82,5 abc	79,7 NS	Ad	66,4 abc	86,2 **	An
Glyphosate ^C	68,8 cd	-		56,4 c		
Glyphosate + Quizalofop	91,0 a	94,5 NS	Ad	72,0 abc	89,6 **	An
Glyphosate + Haloxyfop	76,3 c	93,2 **	An	64,6 abc	91,1 **	An
Glyphosate + Sethoxydim	77,5 c	92,5 **	An	71,1 abc	83,7 NS	Ad
Glyphosate + Clethodim	76,3 c	90,5 **	An	62,7 abc	82,0 **	An
Quizalofop	82,5 abc	-		76,4 ab	-	
Haloxyfop	78,8 c	-		79,6 a	-	
Sethoxydim	75,0 c	-		63,1 abc	-	
Clethodim	68,8 cd	-		60,5 bc	-	
DMS ¹	13,51 d	-		18,04	-	
F	23,97 c	-		3,24 **	-	
CV ²	6,88	-		10,07	-	

¹Diferença mínima significativa, ²Coeficiente de variação; Adição de óleo mineral segundo recomendação do fabricante em todos os tratamentos.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. ^A Sal de isopropilamina, ^B Sal de amônio, ^C Sal potássico.

Em estádios mais avançados, o uso de misturas elevou o controle atingido pelo uso isolado de glyphosate. O uso de quizalofop foi superior ao uso de outros graminicidas em mistura e comportou-se melhor com o uso de glyphosate sal de amônio ou sal potássico. A interferência no processo de transferência de elétrons é mais rápida com a aplicação do glyphosate do que com um inibidor da ACCase (ARALDI et al., 2011), somado a isso, o rápido efeito do glyphosate sal de isopropilamina pode ter diminuído a efetividade do herbicida quizalofop neste caso.

O uso de haloxyfop e sethoxydim foi mais efetivo em misturas com glyphosate sal de isopropilamina e sal de amônio se comparados com a aplicação isolada de glyphosate. O uso de isolado de graminicidas, com exceção de clethodim também mostrou-se efetivo e seu uso isolado pode ser alternativa para diminuir a aplicação do glyphosate, deixando de selecionar plantas resistentes a esta molécula. Outros trabalhos ressaltam, ainda, um elevado controle proporcionado pela aplicação isolada destes herbicidas (FORNAROLLI et al., 2011).

O efeito antagonísticos na maioria dos casos se deve ao fato de esperar-se um controle efetivo com a associação dos produtos, que muitas vezes, não ultrapassou o valor de 80%.

Caso a planta esteja em pleno desenvolvimento vegetativo, talvez outras opções sejam mais eficientes que a aplicação destes tratamentos, como o uso de herbicidas de contato, que diminuem a área foliar da planta, o uso de roçagens anteriores à aplicação de herbicidas graminicidas ou o uso de aplicações sequenciais, como sugerido por outros autores (MELO et al., 2012). O uso destas estratégias são fundamentais para se evitar que ocorra uma seleção de plantas com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ACCase e inibidores da EPSPs como aconteceu com plantas de azevém (HEAP, 2013).

4.4 Conclusões

Dos tratamentos utilizados, conclui-se que todos são eficazes, com exceção do uso de glyphosate isolado no manejo de plantas resistentes de *Digitaria insularis*, porém o controle deve ser feito em estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Neste estágio o uso da formulação glyphosate sal de isopropilamina foi superior as demais formulações testadas. Em estádios mais desenvolvidos das plantas o uso de quizalofop associado a glyphosate sal de amônio ou sal potássico promoveu os melhores controles (superiores a 90%), porém a massa fresca das planta não foi reduzida em mais de 80% em nenhum dos casos. Os herbicidas apresentaram efeitos aditivos se aplicados em estádios iniciais de desenvolvimento e

antagonísticos na maioria dos casos de aplicados em estádios mais avançados. Neste caso, outras medidas de controle somadas a associação de produtos devem ser tomadas.

Referências

ADEGAS, F.S., GAZZIERO, D.L.P., VOLL, E., OSIPE, R. Alternativas de controle químico de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2010, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2010.p 756-760.

ARALDI, R., GIROTTI, M., VELINI, E.D., TROPLADI, L., SILVA, I.P.F., CARBONARI, C.A. Análise de fluorescência e consumo de água em *Brachiaria decumbens* após aplicação de glyphosate e haloxyfop-methyl. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE: USO SUSTENTÁVEL, 3., 2011.Botucatu. **Anais...**, 2011.p.324-329.

COLBY, S.R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicides combinations. **Weeds**,Ithaca, v.15, p.20-22, 1967.

CORREIA, N.M., LEITE, G.J., GARCIA, L.D. Resposta de diferentes populações de *Digitaria insularis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 4, p.769-776, 2010.

DUKE, S.O. Overview of herbicides mechanism of action. **Environmental Health Perspectives**, Research triangle park, n.87, p.263-271, 1990.

FORNAROLLI, D.A, GAZZIERO, D.L.P., BONOTTO, A.T., SANTOS, B.C., DEBASTIANI, R., BANDEIRA, S.A.E. Manejo de biótipos de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glifosato. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE: USO SUSTENTÁVEL, 3., 2011. Botucatu. **Anais...**Botucatu: EPAF, 2011. p.317-320, 2011.

HARTZLER, B. **Wich glyphosate products is best?** Disponível em: <http://www.weeds.iastate.edu/glyphosateformulations>. Acesso em: 11 jan. 2011.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide-R**, 2012. Disponível em: <http://www.weedscience.com/summary/home.aspx> Acesso em: 1º abr. 2013.

LI, J., SMEDA, R.J., SELLERS, B.A., JOHNSON, W.G. Influence of formulation and glyphosate salt on absorption and translocation in three annual weeds. **Weed Science**, Champaign v. 53, p. 153-159, 2005.

LICH, J.M.; RENNER K.A.; PENNER, D. Interaction of glyphosate with post emergence soybean (*Glycine max*) herbicides. **Weed Science**, Champaign, v.45, p.12-21, 1997.

MELO, M.S.C., ROSA, L.E., BRUNHARO, C.A.C., NICOLAI, M., CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas para o controle químico de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, . n.2, v.11, p.195-203, 2012.

MELO, M.S.C., BANZATO, T.C.B., NICOLAI, M., CHRISTOFFOLETI, P.J. Avaliação do crescimento dos biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente e suscetível ao

glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FEPAF, 2010. p.1187-1190.

MOLIN, W.T.; HIRASE, K. Effects of surfactants and simulated rainfall on the efficacy of the Engane formulation of glyphosate in johnsongrass, prickly sida and yellow nutsedge. **Weed Biology Management**, Okayama, v. 5, p. 123-127, 2005.

MONSANTO, Produtos, herbicidas. Disponível em: <http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/roundup/roundup-ready/roundup-ready.asp>. Acesso em: 15 out. 2013.

PROCÓPIO, S.O., PIRES, F.R., MENEZES, C.C.E., BARROSO, A.L.L., MORAES, R.V., SILVA, M.V.V., QUEIROZ, R.G., CARMO, M.L. Efeitos de dessecantes no controle de plantas daninhas na cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v.24, n.1, p.193-197, 2006.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**. 6. ed. Londrina, 2012. 697p.

SHANER, D.; BRIDGES, D. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In: **Herbicide action course**. West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 514-529.

SBCPD. Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. **Procedimentos para instalação, Avaliação e Análise de Experimentos com herbicidas**. Londrina-PR: SBCPD, 1995. 42p.

ARALDI, R., GIROTTO, M., VELINI, E.D., TROPLADI, L., SILVA, I.P.F., CARBONARI, C.A. Análise de fluorescência e consumo de água em *Brachiaria decumbens* após aplicação de glyphosate e haloxyfop-methyl. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE: USO SUSTENTÁVEL, 3., 2011. Botucatu. **Anais...**, 2011. p.324-329.

STAKER, R.J.; OLIVER, L.R. Interaction of glyphosate with chlorimuron, fomesafen, imazethapyr and sulfentrazone. **Weed Science**, Champaign, v.46, p.652-660, 1998.

TIMOSSI, P.C. Manejo de rebrotes de *Digitaria insularis* no plantio direto de milho. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n.1, p. 175-179, 2009.

VELINI, E.D. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, E.D., MESCHÉDE, D.K., CARBONARI, C.A., TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Florestais, 2009. p.113-133.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A planta de *Digitaria insularis* apresentou características foliares que sugerem uma absorção e translocação diferencial do glyphosate. Em estádios vegetativos mais avançados as plantas suscetíveis apresentaram maior presença de tricomas na superfície abaxial da folha. Esta presença, somada a espessa epiderme adaxial, mais a deposição de cera na folha, pode ser uma rota de absorção do produto.

Ainda como característica da espécie, a planta possui naturalmente tolerância à aplicação de herbicidas em estádios mais avançados. A presença de tricomas detectados neste trabalho na superfície adaxial da folha, assim como a formação de densos rizomas detectados em outros trabalhos contribuem para que a planta absorva mais lentamente o herbicida e impedem que esse chegue de maneira eficiente à raiz da planta, fazendo com que ela muitas vezes rebrote mesmo com a perda de sua parte aérea.

Com relação aos estudos enzimáticos, notou-se que a planta de capim-amargoso resistente ao herbicida glyphosate apresenta duas formas da enzima EPSPs, pois possui dois alelos que codificam a enzima. O biótipo suscetível apresenta apenas a forma sensível da enzima. Isso torna a planta resistente ao herbicida não totalmente insensível a aplicação do mesmo. As plantas resistentes possuem uma mutação dupla de aminoácidos na sequência gênica que traduz a enzima EPSPs e possuem menores níveis de expressão enzimática.

Plantas mais distanciadas geograficamente possuem diferente composição enzimática, que pode contribuir de alguma maneira para o comportamento diferencial dos biótipos.

O controle da espécie é facilitado se realizado em estágios iniciais de desenvolvimento. O herbicida glyphosate sal de isopropilamina neste caso foi superior as demais formulações de glyphosate. Todas as misturas com graminicidas foram aditivas. Em estádios mais avançados de desenvolvimento vegetativo, o controle da planta se torna mais difícil e as melhores opções se dão no uso de misturas de glyphosate com graminicidas, ou uso isolado de graminicidas. O uso de quizalofop em mistura com glyphosate sal potássico foi superior aos demais graminicidas. Em estádios mais avançados os tratamentos foram antagonísticos na maioria dos casos.

Mesmo com um controle eficaz, muitas vezes a biomassa da planta não foi totalmente reduzida o que pode ocasionar rebrotas. Assim a adoção de outras estratégias de controle são fundamentais no manejo de plantas resistentes ao herbicida.

ANEXOS

1. Protocolo extração DNA: Doyle e Doyle, 1987 modificado

Colocar no final e numerar no texto

- 1- Triturar aproximadamente 200 mg de material vegetal em nitrogênio líquido.
- 2- Transferir o macerado para tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- 3- Adicionar aproximadamente 1 volume do tampão CTAB.
- 4- Agitar no vórtex.
- 5- Incubar por trinta minutos a 60°C.
- 6- Adicionar 75% do volume de clorofórmio álcool isoamílico 24:1.
- 7- Vortexar.
- 8- Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm.
- 9- Coletar sobrenadante em novo Eppendorf.
- 10- Repetir etapas 7, 8, 9 e 10.
- 11- Adicionar 3 µl de RNase e incubar a 37°C, por 30 minutos.
- 12- Adicionar 0,7 vez o volume coletado de isopropanol.
- 13- Misturar por inversão.
- 14- Centrifugar por 20 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente ou 4°C, descartar sobrenadante.
- 15- Adicionar 500 µl de etanol a 70%.
- 16- Centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm.
- 17- Descartar etanol.
- 18- Secar por 1 hora.
- 19- Eluir pellet DNA com 30 µl de água miliQ autoclavada.

2. Purificação para PCR usando Sulfato de Amônio

- 1) Adicionar Sulfato de amônio 7,5M (2/3 do volume de reação).
- 2) Vortexar ou ressuspender muito bem.
- 3) Adicionar cerca de 80µL de etanol absoluto.
- 4) Agitar.
- 5) Centrifugar durante 45 minutos à 4°C em 4.000 RPM.
- 6) Descartar sobrenadante.
- 7) Centrifugar por 1 minuto a 1.000 RPM (aceleração e brake 1) com placa invertida.
- 8) Adicionar cerca de 150 µL Etanol (70%), não agitar.
- 9) Centrifugar por 20 minutos a 4°C em 4.000 RPM.
- 10) Repetir spin com placa invertida.
- 11) Secar por 1 hora a 37 °C ou por 2 horas à temperatura ambiente, sendo melhor pernoitar.
- 12) Ressuspender com água milli-Q.

3. Alinhamento do DNA de plantas de capim-amargoso em sequências que codificam a enzima *EPSPs*.

```

Planta1      -AC--TCGG--AGTCGA--GCTGCGTC---GAGCTTT---TCT----TGG--CSCCTCT 40
Planta4      GATCGTGGG--CGTCGA---TAAGTT---AGAMTTY---GCW----K-----YYTGS 37
Planta18     ---CTTTGC--AGTCTY--ACKTWRTC---RRCTWTT---TCTMMGACGG--ACTCTTC 44
Planta3      ----GCAGC--AGTCGT--GAGGMGKC----GA-CTTT---TATAGCCGC--GCTCTTC 42
Planta11     --GTACAGC--AGTCST--GAKGCGKC---GA-CTTT---TCTWGGYCGG--ACTCTTC 44
Planta5      --GCCTAGC--AGTCST--GM-GMGKC---GRCTATT---TCTWGGYAGGC-GCTCTTC 45
Planta2      --ATGAATA--AGTCSA--GWGGMGKC---GR-CTTT---TCTWGTCTGSA-GMTCTTC 45
Planta17     ----ACAGC-----AGGCCGC---ATGTTTT---ACAACTTCCCCGGAWCTTC 38
Planta20     CTTATCAGT--CTYAG---AGGMGTC---GATCTGT---AGAAATYAGMRK-TCTGC 46
Planta15     ---GTCAGC--TTTCGA--GWKGCRC---GRCTTTT---CTWGGKWCG--GGCTCTTC 44
Planta13     ---GTCAGA--AGGCGA--GMTGCGKC---GRCTWTT---CTWGGYAM---GCCTCTTC 43
Planta16     ---GTCAGC--AGGCGC--GCTGCRKC---GAGCWTT-----TCTTGGYAGCACTCG 42
Planta23     --AACTAGC--AGTCCGT--GAGGCGTC---GAGCTTT---TCTAGTGGC--SCTCTTC 46
Planta24     --TGTCAGC--TGTCMTYASAGCGTC---GACTTTTATACMTTGTGKCAK--R-TCATM 49
Planta6      ---GTTTAT-CAGCGT---GAGGCGKC---GRCT-TT---TCTWGGCCGS---CTCTCT 42
Planta21     ---GTCTTT-CTGTATT--GAGGTATCTAGGGAGC-CA---TYGMKAKMTA---TRYTMS 47
Planta9      ---ATCAGC--AGGCKMW--GAGGCGKC---GRCTATW---TCTWGWKWMGC---CTCWTC 44
Planta7      ---GCGAATGCAGTAGT--GMG-CGKC---GRCT-TT---TMTTGGYCGC---WSYACA 43
Planta10     --CACAAAT-CAG-ACC--GATC-GTC---GACTTTT---CTTGGTGSSW---YTCTCT 43
Planta25     --TTCCAGC-AAG-ACT--CATTTATC---AACACMT---TCC---GCGA---ATCWTM 41

Planta1      TCTTGGGGATGCTGGAACGGCAATGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 100
Planta4      TATGTGGCAWGTGGAACKGCAATGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 97
Planta18     T-TGGGGAATGCTGGAACGGCAATGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 103
Planta3      T--TGGG-ATGCTGGA-CGGCA-TGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 97
Planta11     T--TGGGGATGCTGGA-CGGCA-TGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 100
Planta5      T-TGGGGAATGCTGGA-CGGCA-TGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 102
Planta2      T---TGGGATGCTGGA-CKGCAATGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 101
Planta17     TT--GGWGATGCTGGAACGGCA-TGCGTACATTGACAGCGGCWGTGACTGCTGCTGGTGG 95
Planta20     TA--TGGGATGCTGGAACGGCA-TGCGTMCATTGACAGCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 103
Planta15     T---TGGGATGCTGGA-CKGCA-TGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 99
Planta13     T---TGGGATGCTGGAACKGCA-TGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 99
Planta16     C---AGSGATGCTGGA--CRCA-TGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGG 96
Planta23     T-TGWGGC-TGCTGGA-CGGCA-TGCGTCCATTGACAGCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 102
Planta24     TCTGTGGCATGCTGGARCTCAATGCGTCCATTGACAGMGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 109
Planta6      T---GGAT--GCTG--ACGC--ATGCGTCCATTGACAGCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 93
Planta21     T---GAGCCAGCTGG-ACKRCAATGCGTCCATTGACAGCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 103
Planta9      T---TGGGATGCTGGAACKRCAATGCGTCCATTGACAGCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 101
Planta7      G---TGAKGWGCCR---C---ATGCGYCCATTGACAGCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 93
Planta10     G---TGGCATGCTGG-ACKRC-ATGCGTCCATTGMCWCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 98
Planta25     T---TGAGATGCWGG-ACTGM-ATGCGTCCATTGACAGCGGCYGTGACTGCTGCTGGTGG 96
                **                ****  ***** * * ***  *****
Planta1      AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAACTTCCAAGGGTACATCTAGKGGCTT 160
Planta4      AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAACTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 157
Planta18     AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAACTTCCAAGGGTACATCTAGKGGCTT 163
Planta3      AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAACTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 157
Planta11     AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGTGCAACTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 160
Planta5      AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGTGCAACTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 162
Planta2      AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAACTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 161
Planta17     AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAMCTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 155
Planta20     AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAMCTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 163
Planta15     AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAACTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 159
Planta13     AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAACTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 159
Planta16     AAATGCAACGTATGATCTATTTATGCTTTGKGCAYTTCCATGGGTACATCTAGKGGCTT 156
Planta23     AAATGCAACGTATGWYTMTTTAKGCTTTGTGCAACTTCCATGGGTAYRTCYAGTGGCTT 162
Planta24     AAATGCAACGTATGWTTTMTTAKGCTTTGTGCAACTTCCATGGGTAYGTCTCYAGTGGCTT 169
Planta6      AAATGCAACGTATGWTC-CTTARGCTTTGGGGMACTTCCATGGGKATGTCTAGKGGCTT 152
Planta21     AAATGCAACGTATGWYTT-CTTARGSTTTGKGCAACTTCCATGGGKATGTCCAGKGGCTT 162
Planta9      AAATGCAACGTATGWTC-CTTARGCTTTGGGCCACTTCCATGGGKATCATCAGKGGCTT 160
Planta7      AAATGCAACGTATGATCT-CTTARGGCTTTGGGGCACTTCCATGGGKATCWTCAAGTGGCTT 152
Planta10     AAATGCAACGTATGATCT-CTTARGSTTTGKGCMACTTCCATGGGKATGTCCAGGGSTT 157
Planta25     AAATGCAACGTATGWTTT-CTTARGSTTTGKGSMACTTCCATGGGTATGTCTAGTGGCTT 155
                ***** * * *** * *** * ***** * * ** * *

```


Planta1 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGGARA 220
 Planta4 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGGARA 217
 Planta18 ATTGTGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGKGCTTGAKGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 223
 Planta3 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGGARA 217
 Planta11 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGGARA 220
 Planta5 ATTGTGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGGARA 222
 Planta2 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGGARA 221
 Planta17 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 215
 Planta20 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 223
 Planta15 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 219
 Planta13 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 219
 Planta16 ATTGKGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 216
 Planta23 ATTGTGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 222
 Planta24 ATTGTGTATCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 229
 Planta6 ATTGGGGARCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 212
 Planta21 ATTGGGGARCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 222
 Planta9 AATGGGGARCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 220
 Planta7 AATGGGGARCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 212
 Planta10 AATGGGGARCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 217
 Planta25 ATTGGGGARCTTTTTTGAACCTTCAGTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAAKGAGGGARA 215
 * * * * *

Planta1 GACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 280
 Planta4 GACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 277
 Planta18 GACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 283
 Planta3 RACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 277
 Planta11 GACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 280
 Planta5 GACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 282
 Planta2 RACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 281
 Planta17 RACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 275
 Planta20 RACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 283
 Planta15 RACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 279
 Planta13 RACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 279
 Planta16 RACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 276
 Planta23 GACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 282
 Planta24 GACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCC 289
 Planta6 AACCAATTGGSSACCTGGKTGGCCGAATGAAACCRCTGGGSKCGGAAGGTGATTGTTTCC 272
 Planta21 AACCAATTGGSSACCTGGKTGGCCGAATGAAACCRCTGGGSKCGGAAGGTGATTGTTTCC 282
 Planta9 AACCAATTGGSSACCTGGKTGGCCGAATGAAACCRCTGGGSKCGGAAGGTGATTGTTTCC 280
 Planta7 AACCAATTGGSSACCTGGKTGGCCGAATGAAACCRCTGGGSKCGGAAGGTGATTGTTTCC 272
 Planta10 AACCAATTGGSSACCTGGKTGGCCGAATGAAACCRCTGGGSKCGGAAGGTGATTGTTTCC 277
 Planta25 AACCAATTGGSSACCTGGKTGGCCGAATGAAACCRCTGGGSKCGGAAGGTGATTGTTTCC 275
 * * * * *

Planta1 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 340
 Planta4 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 337
 Planta18 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 343
 Planta3 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 337
 Planta11 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 340
 Planta5 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 342
 Planta2 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 341
 Planta17 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 335
 Planta20 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 343
 Planta15 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 339
 Planta13 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 339
 Planta16 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 336
 Planta23 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 342
 Planta24 TTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCARGGGGATKGGAGGGCTACCKGGCGGCAAGG 349
 Planta6 TTGGSMCTGACTGGCCCCCTGGTCCATCMAGGGGATGGAAGGCTACCTGGSSGCMAGG 332
 Planta21 TTGGSMCTGACTGGCCCCCTGGTCCATCMAGGGGATGGAAGGCTACCTGGSSGCMAGG 342
 Planta9 CTGGSMCTGACTGGCCCCCTGGTCCATCMAGGGGATGGAAGGCTACCTGGSSGCMAGG 340
 Planta7 CTGGSMCTGACTGGCCCCCTGGTCCATCMAGGGGATGGAAGGCTACCTGGSSGCMAGG 332
 Planta10 TTGGSMCTGACTGGCCCCCTGGTCCATCMAGGGGATGGAAGGCTACCTGGSSGCMAGG 337
 Planta25 TTGGSMCTGACTGGCCCCCTGGTCCATCMAGGGGATGGAAGGCTACCTGGSSGCMAGG 335
 * * * * *

```

Planta1      TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCGAGA 400
Planta4      TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCGAGA 397
Planta18     TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCGAGA 403
Planta3      TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCGAGA 397
Planta11     TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCGAGA 400
Planta5      TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCGAGA 402
Planta2      TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCGARA 401
Planta17     TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCRAGA 395
Planta20     TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCRAGA 403
Planta15     TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCRARA 399
Planta13     TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCRARA 399
Planta16     TTAGTTACCAATTTCCACATGCTACATTCTTCTATGTATGATTGAACTCCTTTTTTCRAGA 396
Planta23     TTAGTTACCAAKTTCCACATGCTACATTCTTCTRTGTATGGTTGAACTCCTTTTTTCRAGA 402
Planta24     TTAGTTACCAAKTTCCACATGCTACATTCTTCTRTGTATGGTTGAACTCCTTTTTTCAGA 409
Planta6      GTARTTACCMARTCCACATGCTACATTCTTCTCCGWWGATGGGTGAACTCCTTTTTCAARA 392
Planta21     GTARKTACCMARTCCCAMMTGCTACATTCTTCTCCGWWGATGGGTGAACTCCTTTTTCAARA 402
Planta9      GTARKTACCAARTCCACATGCTACATTCTTCTCCGAGGATGGGTGAACTCCTTTTTCAARA 400
Planta7      GTWAKTWCCMARTCCCAACWGGYACMTTCTTCCGWWGWWGGTGAACCCCTTTTTCAARA 392
Planta10     GTARTTACCAARTCCCACTGCTACMTTCTTCTGWWGATGGGTGAACTCCTTTTTCAAGA 397
Planta25     GTARKTACCAARTCCCAAMTGCTACMTTCTTCTGWWGATGGGTGAACTCCTTTTTCAAGA 395
          *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Planta1      TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 458
Planta4      TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 455
Planta18     TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 461
Planta3      TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 455
Planta11     TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 458
Planta5      TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 460
Planta2      TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 459
Planta17     TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 453
Planta20     TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 461
Planta15     TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATARATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 457
Planta13     TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 457
Planta16     TAATGCGTTTGTAAARAAA-CATARATARATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGMAAAATAAACC 454
Planta23     WAATGCGTTTGTAAAGAAAR-CATAGATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 460
Planta24     WAATGCGTTTGTAAAGAAAR-CATAGATAGATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 467
Planta6      AWATGCSSTTTGGWAGAAAATA-RAWWW-WTTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 449
Planta21     AAATGCSSTTTGTAAARAAAATA-AATAR-ATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 459
Planta9      AWATGGSSTTTGGWAAARCCW-WAATA-RATTTGATTAACCTTTAC-ATGG-GMAATTACT 456
Planta7      AAAATGSKTTGTAAARAAAACATAAWTW-GATTTGATTAACCTTTAC-ATGG-GMAATAACT 450
Planta10     AWATGCKTTTGTAAAGAG-CATTAATA-RKATTGATTAACCTTT-T-ATGGSMAA-TAACT 452
Planta25     AWATGCSSTTTGTAAARAAAACATAATTR-ATTTTGATTAACCTTTAC-ATGGCAAAATAAACC 453
          *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Planta1      TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 512
Planta4      TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 509
Planta18     TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAAGCTCAGCCAAGTCT 515
Planta3      TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 509
Planta11     TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 512
Planta5      TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAAGCTCAGCCAAGTCT 514
Planta2      TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 513
Planta17     TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 507
Planta20     TAATAAATCGTCCCAAACCARCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 515
Planta15     TAWTAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCARCCAAGTCT 511
Planta13     TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAASCTCAGCCAAGTCT 511
Planta16     TAATAAATCGTCCCAAACCAGCAAGCCATA--TTTTG----TTTAAGCTCAGCCAAGTCT 508
Planta23     TAATGTCWTCCCCCAAAACC--RAGCCATATATTTTG----TTTAATCTC---CAAGTCT 511
Planta24     TAATGTCWTCCCCCAAAACC--AAGCCATA--TTTTG----ATTAAGCTCTCCCAARTCT 519
Planta6      TAATGWCATCCCCC---CCAGCA-GCCATA--TTATGAT-GTTTA---TC-CTCAAGTCT 498
Planta21     TAATGTCATCCCAAG---CCASCA-GCCATA--TTAT----TTTAAGCTC-CTCAAGTCT 508
Planta9      TAATGACATCCCC---CCAGCA-GCCATA--TTATGATTGTTTA---TC-CTCAAGTCT 505
Planta7      TAATGKCATCCCCCCCCASCAGCC-GCCATA--TTTTG----TTTA---TC-CTCAAGTCT 499
Planta10     TAATGTCATCCAAG---CCAGCAAGCCATA--TTATGA-----TGTTCTC-CTCAAGTCT 501
Planta25     TAATGTCATCGTCC---CCAGCA-GCCATA--TTATGA-----TGATCTC-ATCAAGTCT 501
          ** *      *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Planta1 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 568
 Planta4 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 565
 Planta18 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTAGTTCCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 571
 Planta3 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 565
 Planta11 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 568
 Planta5 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 570
 Planta2 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 569
 Planta17 TACTCAKCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 563
 Planta20 TACTCAKCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 571
 Planta15 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 567
 Planta13 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTASTTCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 567
 Planta16 TACTCAGCATATG---TTTAGCAACTTAGTTCCCTATCTTCTGGGGTAATGCATGTTGTT- 564
 Planta23 TACTCTCMRTATGT-GTTTAGCT-CTTATCCCCC-TTGTGGGGGTAATGCATGGTGWT- 567
 Planta24 TACTCTCCATATG---TTTAGCAACTTAKTTCCACCTTGTGGGGKAATGCCTGTGGTTC 576
 Planta6 T-CTCCTCATATGATAGC-A-CTTCTTACCACCTA--TCT--GGGGGATGC-TGTTGTC- 549
 Planta21 TACTCCTCATATGATGTTA-CTTCTTCCCACCT---TCT--GGGGGATGCCCKGWTGTC- 561
 Planta9 TACTCCTCATATGATGTTA-CTTCTTCTCCTTCT-TCT--GGAGGMC---TGTTGTC- 557
 Planta7 TACTCCTCATATGATGTTTAGCAACTTASCACCTATCTTC--GGGGGC--CKGWTGTC- 554
 Planta10 TACTCCTCATATGATAGCAA-CTTAGTACCACCTTG-TTC--GTATGMTG-CW--TGTC- 553
 Planta25 TACTCCTCATATGATAGCA--CTACTASYACCTTG-TTC---TGTAATG-CTGWTGTC- 552
 * * * * * * *

Planta1 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 623
 Planta4 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 620
 Planta18 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 626
 Planta3 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 620
 Planta11 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 623
 Planta5 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 625
 Planta2 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 624
 Planta17 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 618
 Planta20 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 626
 Planta15 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 622
 Planta13 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 622
 Planta16 -AAATCATGAATTASCTCTTATAATTTGT-TATGCTCTGCAGG-TTAAGCT--ATCTGGT 619
 Planta23 -AAATCAAGAATTATCTCTTATAATTTG-ATATGCTCTGCAGT-TAAAGCT--ATCTGGT 622
 Planta24 AAAATGAATTATTATCTTATA-AATGTGTGTATGGCCTGCARG-TTAARCTGTATCTG-T 633
 Planta6 --W-TCATCATTA-KCTCT-ATTATATGT--GTGGTCTGCTGC-AKGAGCTGTATCTGGC 601
 Planta21 --W-TCATCATTA-KCTCTTATWATGTGT--GTGGTCTGCTG--GTTATCTGTATCTGGC 613
 Planta9 --W-TCATCATGA-KCTCT-ATTATGTGT--GTA---TGCTGTGGTTAKCTGTATCTGTC 607
 Planta7 --AATCATCATGAATYACTTCTTATATGT-TATGGGCT-CYGC-AKGWTATCTATCT-GC 608
 Planta10 --W-TCATCATTA-GYACTTATTATGTGT--GTGGTCTGCAGG-TTAAGCTGTCTCTTCC 606
 Planta25 --A-TCATGAAGA-GTACT-ATTATGTGT-TATATGCTGCTGG-TTAAGCTGTATCTTCC 605
 * * * * * * *

Planta1 TCGATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 682
 Planta4 TCGATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 679
 Planta18 TCGATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 685
 Planta3 TCSATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 679
 Planta11 TCGATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 682
 Planta5 TCGATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 684
 Planta2 TCGATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 683
 Planta17 TCSATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGRGGA 677
 Planta20 TCSATCAGCARWCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTASCTCTTGRGGA 685
 Planta15 TCSATCAGCARWCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGRGGA 681
 Planta13 TCSATCAGCARTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA 681
 Planta16 TCSATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGRGGA 678
 Planta23 TCKATCARCAGWCAATACTTGAGCGCCTGTGCTGAKGGGCGCTCCT--AKCTCTCGTGGA 680
 Planta24 TCCATCACCAGTCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGGCTGCTCCTTTWKCTCTCGKGA 692
 Planta6 W---TCAKCAGYCW-YACTTGAGCGC-G-CGCTGATGACTGCTGCTCTAKCTCTCGTGA- 654
 Planta21 W---TCAKCAGYCAATACTTGAGCGC-G-CGCTGATGACTGCTGCTY-AGCTCTCGTGGA 667
 Planta9 T---TCATCAGCCW-TACTAGAGCGC-G-CGYTGATG-YTGCTGCTCTAKCTCTTCTKGA 660
 Planta7 T---CCATCAGYCW-YACTTGAGAGC-G-YCTTGATGAC-GCTGCTCTAKYTCTCKTGA- 660
 Planta10 A---TCATCAGYCAATACTTGAGCGCCT-TGCTGATGAYTGCTCCTC-AKCTCTTGTGTA 661
 Planta25 A---TCATCAGTCW-CACTAGAGAGC-T-TGCTGATGACTGCTGCTC-AGCTCT--GTGA 656

* * * * * * * * * * * * * * * *

Planta1	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	737
Planta4	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	734
Planta18	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	740
Planta3	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	734
Planta11	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	737
Planta5	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	739
Planta2	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	738
Planta17	TGTG-GAGATTGAGATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	732
Planta20	TGTG-GAGATTGASATCATTGATAAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCRAAATGACA	740
Planta15	TGWG-GAGATTGASATCATTGATMAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	736
Planta13	TGWG-GAGATTGAGATCATTGATMAAC-TAATCTCCATT---CCCTATGTCGAAATGACA	736
Planta16	TGTG-GAGATTGASATCATTGATMAAC-TAMTCTCCMTT---CCCTATGTCRAAATGACA	733
Planta23	KATGTGAGAKAGAGAKAWCWGTGATAAATAATCTCTACT--CTCCYATATCKAGATGACA	738
Planta24	TGTGKGAGATTGAGATCWYTGAGAWAC-TATTCTCCAYWT-CTCCTATGTCKAAATGACA	750
Planta6	-GAG-GAGAT-GTGATCATCGATGAWC-TA-TCTC-WTC--TYA-TACGTA---RT-AC-	700
Planta21	TGAK-GAGAK-GAGATCATCGATGAWC-AC-TCTC-ATA--TCTCTACGTC---RT-ACG	716
Planta9	TGAG-GAGAT-GTG-TCATCG-TGAWC-TACTCTCCATCATTTATGACGT---AT-ATG	710
Planta7	-GAG--AGAK-AAGAACATCG-TGAWC-TACTCTC-ACA--TCTCGACGTC---RT-ATG	707
Planta10	TGAG-GAGATTGAGATCATCGATGATC-TACTCTCCATCA-TTTAGACGTC---GT-GTG	714
Planta25	TGTG--AGAK-GAGATCATYGATGWCT---CTCTC-WTTM-TTYAGACGTC---RT-GTG	704
	*** * **** * *	

Planta1	TTGAKATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCASAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	791
Planta4	TTGAGATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCAGAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	788
Planta18	TTGAGATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCAGAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	794
Planta3	TTGAGATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCAGAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	788
Planta11	TTGAGATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCAGAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	791
Planta5	TTGAKATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCAGAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	793
Planta2	TTGAKATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCASAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	792
Planta17	TTGAKATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGCASAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	786
Planta20	TTGAKATTGATG-GAKCGTTTT-GGCGTGA-AAGCASAGCACTCTGATAGCTG-GRAC--	794
Planta15	TTGAKATTGATG-GAGCGTTTT-GKCGTGA-AAGCASAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	790
Planta13	TTGAKATTGATG-GAGCGTTTT-GGCGTGA-AAGMASAGCACTCTGATAGCTG-GGAC--	790
Planta16	TTGAKATTGATG-GAGCGTKTT-GGCGTGA-AAGCAGAGCACTCTGATAGCTG-GGAS--	787
Planta23	TTGAGAKAGAGGTGAGAGCTTT-GKGCGCW-AARCRAGAACTCTGAKCTSTGGAC--	794
Planta24	TTKAGATAGWGAGGAGCGCKTTTGTGCGYWGWAARCRSAGAACTCTGAGAKCTSGGGAC--	808
Planta6	ACGTGAT-G-TG-A-GCATGT--GTCGS-A---GA-GAGCA-CCTGATR-CWG--TAC--	743
Planta21	WCGTGAT-GATG-T-G-ATGT--GTCGC-A---GA-GAGCA-CMTGATRATTG--TAC--	760
Planta9	TTGTGAT-GATG-ATGCGCGT--GKCGC-T---GGCGAGCAGTCTGATGACTG--TAC--	758
Planta7	T-AAGAT-G-TG-ATG-ATGT--GTCGC-A---GA-GAGCA-CATTATA-TTG--TACGC	751
Planta10	TTGATATTAATG-AAG-ACKT--GGCGC-T---RGCAG-A-TATGATGAYTC--TAC--	760
Planta25	ATGAGAT-GATG-AAG--CGC--TGCGTGT---GACGAC-ACTCTGAT-ACWC--GAC--	749
	* * * * *	

Planta1	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAS-TTCTATAGGGTTTTTTTT	845
Planta4	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAS-TTCTATAGGGTTTTTTTT	842
Planta18	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAG-TTCTATAGGGTTTTTTTT	848
Planta3	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAG-TTCTATAGGGTTTTTTTT	842
Planta11	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAS-TTCTATAGGGTTTTTTTT	845
Planta5	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAG-TTCTATAGGGTTTTTTTT	847
Planta2	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAS-TTCTATAGGGTTTTTTTT	846
Planta17	AGGTTCTGCATCRR---GGGASG---ACAAAAATACAARTAS-TTCTATAGGGTTTTTYT	840
Planta20	AGGTTCTGCATCAR---GGGASG---ACAAAAMTACAARTAS-TWCTATAGGGTTTTTYT	848
Planta15	AGGTTCTGCATCRR---GGGASG---ACAAAAATACAARTAS-TTCTATAGGGTTTTTTTT	844
Planta13	AGGTTCTGCATCRA---GGGAGG---ACAAAAATACAAGTAAS-TTCTATAGGGTTTTTTTT	844
Planta16	AGGTTCTGCATCRR---GGGAGG---ACAGAAATACAAG-AAG-TTCTATAGGGTTTTTTTT	840
Planta23	ACGKTCTCCGTCTM--RGGGGGAKACAARTACACRWGWRWK-CTCTAKWKGGCTTTTTT	851
Planta24	ASGTGCTCCGTCTM--RGGGGGKACMAARWACACRAAAARWKCTATAKWKCTTTTTT	866
Planta6	AACCTCTACTTCAT--GAGACG-----ACAGACACTAGGWWC--A-CARW--GCTT----	787
Planta21	AACWTCTACTTCAT--GAGACG-----AAGTACASTAGGWAC--T-CARTT-GCTTT---	806
Planta9	AACCTGTACTTCATCRAAGACG-----AAGTACTCTAG-TTC--A-CAGAT-GCATT---	805
Planta7	AGCTT---CTTCAT-GRAGACG-----AG--ACAGTAGGAAC--T-CAATT-KCTTT---	793
Planta10	AACWTCTACTTCAT-CRAGACG-----AGT-CTSTAAGWAC--TACARTAGGCACT---	807
Planta25	AGTCTCT---CAT-CAGAACG-----CAGTACTSTAGW--C--TAYA-TA--TCCT---	789
	* * * *	

Planta1 TT-CGCACTTCTTTGATGTTAAASATTCTAGTTKCAGTATGTCTAACCAATCACTGATGT 904
 Planta4 TT-CGCACTTCTTTKGATGTTAAAGATTCTAGTTKCAGTATGTCTAACCAATCACTGATGT 901
 Planta18 TT-CGCACTTCTTTKGATGTTAAAGATTCTAGTTKCAGTATGTCTAACCAATCACTGATGT 907
 Planta3 TT-CGCACTTCTTTGATGTTAAAGATTCTAGTTKCAGTATGTCTAACCAATCACTGATGT 901
 Planta11 TT-CGCACTTCTTTGATGTTAAAGATTCTAGTTKCAGTATGTCTAACCAATCACTGATGT 904
 Planta5 TT-CGCACTTCTTTKGATGTTAAAGATTCTAGTTKCAGTATGTCTAACCAATCACTGATGT 906
 Planta2 TT-CGCMCTTCTTTKGATGTTAAASATTCTASTTKCAGTATGTCTAACCAATCACTGATGT 905
 Planta17 YW-CGCMCTTSWTKGAWGWKAAASWTKCTASTTKCAGTMYGTCTRACCAMTSACKGATGT 899
 Planta20 YT-CGCACTTCTTTKGATGTTAAASATKCTASTTKCAGTMYGTCTAACCAATCACTGATGT 907
 Planta15 TW-CGCMCTTCTTTKGAWGWTAAAGATTCTASTTKCAGTAYGTCTAACCAATCACTGATGT 903
 Planta13 TTTTCGCMCTTCTTTGATGTTAAASATTCTASTTKCAGTMYGTCTAACCAATCACTGATGT 904
 Planta16 TT-CGCMCTTCTTTGAWGTAAASATKCTAGTTKCAGTMYGTCTAACCAATCACTGATGT 899
 Planta23 CK---CCCTTCTTCGTTGATGAARAWTCTWSTWKCTKGAKGWCCWCYCRACAACCGMTGW 908
 Planta24 CK---CCCTTCTTCGWTGATGAWRATKCTACTTGCAGGATGWCGWCCCRAYCACTGMTGT 923
 Planta6 ---CKCACTTCT---CATG-KAG-GAT---CAGCTACATGA-GTCC-AC-AATCA-TGACG- 833
 Planta21 ---CKCACTTCT---CATG-GAG-GAT---CAGCTACATGATGTCC-AC-GATCACTGATG- 854
 Planta9 ---CKCACTTCT---CATG-TAG-KAT---CAAGYAC-KGATGTCTG-AC-GATCACTGATG- 852
 Planta7 ---CGCACTTCT---GATG-GAG-GAT---CAKCTRCAKGA-GTCC-RA-CACCACTCAYG- 840
 Planta10 ---CGCACTCTTT-SAGG-AAAAGAT---CAGCAC---KGATGTCCRAC-GATCACTGATG- 856
 Planta25 ---CGYACTCT---SATG-TAR-GAT---CWGCTS---AGM-GTC---RC-GATCACTSATG- 832
 * * * * *

Planta1 ACCAATACTTGAACACATAAAAT-TATTGATRTT-GGCTCAGTAAA-TTGTTY-AATCAT 960
 Planta4 ACCAATRCTTGAACACATAAAAT-KATTGATRTT-GGCTCAGTAAA-TTGTTY-AATCAT 957
 Planta18 ACCAATRCTTGMACACATAAAAT-TATTGATRTT-GGCTCAGTAAA-TTGTTY-AATCAT 963
 Planta3 ACCAATACTTGMACACATAAAAT-TATTGATATT-GGCTCAGTAAA-TTGTTY-AATCAT 957
 Planta11 ACCMATRCTTGAACACATAAAAT-TATTGATATT-GGCTCAGTAA--TTGTT--AATCAT 958
 Planta5 ACCMATRCTTGAACACATAAAAT-TAT-GATATT-GGCTCAGTAAA-TTGTT--AATCAT 960
 Planta2 ACCAATRCTTGMACACATAAA-T-TATTGWKATT-GGCTCA-TWAA-TTGTTT-AATCAT 959
 Planta17 ACCCATRCTTGMACACATAWAAT-KATTGAKATT-GMCTCARTAAATTTTTTY-AATCAT 956
 Planta20 ACCMATRCTTGMACACATAWAAT-GATTGAKRTT-GGCTCAGTAA--TTGWTY-AATCAT 962
 Planta15 ACCMWTCTTGMACACATAWAAT-TATTGWKRTT-GGCTCAGTAAA-TTGATY-AAYCAT 959
 Planta13 ACCMATRCTTGMACACATAWAATTKATTGAKATT-GGCTCAGTAA--TTGTTY-AATCAT 960
 Planta16 ACC-ATRCTTGAACACAWAWAAT-KATTGWKRYT-GGCTMRTTAA--TTRTYA-AWYCAT 953
 Planta23 WGCACCACTWCTAGACCTCATAATWATTGWTRTT-GKCGCMKCAAW-TWATTTGAWTCAT 966
 Planta24 TKCAMYACTTGWACACCYMAWA-TWATTGATRWTTGKCKCMKYAAT-WTATTTKWATCAT 981
 Planta6 A--CATAC-TG-WTRCAC-AT---TA-TGAATG---CTG-ST-AA--TATGA---TCA- 872
 Planta21 TATCATACATGCACRCAC-AT---TA-TGAAGA--GAYTGACTCAG--TATTA--TCAT 902
 Planta9 A-TSAYACTTGMTGCGAYCAT---TACTGAAGA--G-KCGRST-AA--GATGR--ATCAT 900
 Planta7 ATCAACACTTGMTYGATCAAT---TA-CKAATA--GWCTG-STAAG--TATTG--ATCAT 889
 Planta10 ATCWATCCTTGACACAYCAT---TT-TGATTT--GGCTCASTMAA--TATTT--ATCAT 906
 Planta25 ATSA-TM--TGATCGCATCMA---TA-TGATGW--GC-----TSAT 864
 *

Planta1 CTAGCTCA--GTCC-RTTGG-MGASA--TGGAAGTAWR-CTG-AAAGCTA---AGCAAWA 1009
 Planta4 CTMGCTCA--GTCC-RTTGG-MGASA--TGGAAGTAAG-CTG-ACAGCTA---GCAAAA 1005
 Planta18 CTAGCTCA--GTCC-RTTGG-AGACA--TGGAAGTAA--CTG-AAAGCTA---AGCAAA- 1010
 Planta3 CTAGCTCA--GTCC-RTTGG-ARASA--TGGAAGTAA--CTG-AAAGCTA---AGCAAAA 1006
 Planta11 CTAGCTCA--GTCC-RTTGG-AGACA--TGGAAGTAA--CTG-AAAGCTA---AGCAAAA 1003
 Planta5 CTAGCTCA--GTCC-RTTGG-AGACA--TG-AAGTAA--CTG-AAAGCTA---AGCAAA- 1005
 Planta2 CTAGCTCA--KYCC-RTTGGAGASA--TGGAAGTMAR-CTG-AAARCTA---AGCAAWA 1009
 Planta17 CTMGCTCA--KWYCYRTWGG-MGASGA-TGGWAGTMAARCWGGACWRCTC---AGCAATA 1009
 Planta20 CTMRCTCA--TTCC-RTTGG-MRASR--TGGAAGTMAR-CTG-AMWRCTA---AGMAMAA 1011
 Planta15 CTMRCTCM--TTCC-RTTGG-ARACR--TGGAAGTAA--CTGRAMAGCTA---ARCAAAA 1008
 Planta13 CTARCTCA--KTCC-RTTGG-AGASA--TGGAAGTMAR-CTG-AAWRCT---ARCAAWA 1007
 Planta16 CTAGCTCA--KTCC-RTTGR-MGASK--WGAAAGMAA--CTRAAAARCTA---AGMAAAA 1002
 Planta23 CTTCWCATSWCTMCTTGT-AGWCAYAGTGAAGWRAA-CWSWGAAC-KATACASCAAMA 1023
 Planta24 CTACCTCMW-SWCTMCYGTGTGAGWCAY-GKGAAGWRWA-CWSWGAAMCKMMWMMACAAMW 1038
 Planta6 -CA-CT---CACTCCAYC-W-GATCA---TCKA-TGA--CTG-CTA-CWG---CKCGACC 914
 Planta21 CCAKCT---CACGTCATCGT-AGTCA---TGTAAGTGA--CTG-CTAGCWS---CKCGACA 949
 Planta9 CTATCTAAAMGTAYMTTGT-AGTCA---WCKAATGA--CTG-CTG-MTG---CTCGACC 949
 Planta7 CCATCT---AAGCAAYC-W-GATCA---WCGWGTGA--CTG-CTGACWG---CTCGACC 934
 Planta10 -CAKTM---SGTAT-----ACCG---TAGCAWGA--GTG-CWG-CTA---CTGK-CG 943
 Planta25 -CAT-----ATGA--TCA-YAG-CT----- 879

Planta1	-CTT-AGKTKGGTWTGCCT-ATTATATCT-A-GCTGC-ATTGWAC--GGRG-GACTRRT-	1059
Planta4	-CTT-AG--TGGTWTGCCTTATTATATCT-A-GCTGC-AT-GTAC--GGGG-GACTRRT--	1052
Planta18	-CTT-AGT-TGGTATGCCT-ATTATATCT-A-GCTGC-ATTGTAC--GGGG-A--YATT-	1057
Planta3	-CTT-AGTTGGGTATGCCT-ATTATATCT-A-GCTGC-ATTGWAC--GGGRSGAMTRT--	1056
Planta11	-CTT-AGTTGG-TWTGC-T-ATTATATCT-A-GCTGC-AT-GTAC--GGG---AYRT--	1047
Planta5	-CTT-AGT--GGTATGCCT-ATTATATCT-A-GCTGC-ATTGTAC--GGRG--GAYRT--	1051
Planta2	-CTT-AGT-TGGTATGCCT-ATTATATCT-AAGCTKC-ATTGW-C--GGR--GAYRTA-	1057
Planta17	-CTTTAGGTGRGTATGCCTTATTATA-TC-TAGCTGC-RTTGTAC--GGGASGACTAGT-	1062
Planta20	-CTT-AGGTGGGTWTGCCTTATTATA-CT-AAGCTGC-RT-GTAS--GGR-SGAY--RT-	1059
Planta15	-CTT--AGTGRK-ATGCCTTATTATWCT-AAGCTKC-ATTGGWC--GGGRGGACT-RT-	1058
Planta13	-CTT--AGTTGK-WTGCCTTATTATATCT-AAGCTKC-ATTGTAC--GGG-RGACT-RT-	1056
Planta16	-CTT-ARKTGGGTATGCCT-ATTWWAWCT-AAGCTKC-ATTGGTA--GGG-CGACRTTA-	1053
Planta23	TYWT-ATGTGRTGRTRYCTTATTATCTAWGMTGCTRCTGTCTRCAC-GGGGASAA-TAKTY	1080
Planta24	TCWTTWTGKKATR-TRYMTTATTATYYTM-ATGMTGCRYTYGYRCAGGGGACAAMTWGYM	1096
Planta6	TCCT---C-KRTTA--TGACATAYA-KCA-----GC-AT--SAC-A-CGACA-CTRCT-	954
Planta21	TCGT--AC-GRTTAGACGATAYAC--KCA-----TGC-AK--GCT-ATCGGCAACTGCT-	994
Planta9	ACTG--ACTGATTA----GCATWCGAKMW-----GC-ATTGYWC-AWCGACA-CTRCT-	993
Planta7	ACT---AM-GRTTA-----GCAATCA--MT-----WGC-AG---TG-AAAGGCAACTGCT-	973
Planta10	ACTC--TTTGGTGG-----TATC-	959
Planta25	-----	

Planta1	ACGW-AGA-CATGAY---AGCAGCA--CA-CTAGC---ATCTTATTG-AT-TAS-TGGCT	1105
Planta4	ACWT-AGA-MATGAT---AGCAGCA--CA-CTAGC---ATCTATTTG-TA-TAS-TGCCCT	1098
Planta18	ACGT-AGA-CATGAT---AGCAGCA--CA-CTAGC---AYCTATTTG-A--TAS-TGGCT	1102
Planta3	ACRT-AGA-SATGAY---AGCAGCA--CAACTAGC---ATCTA-TTG-A--TAS-TGCTT	1101
Planta11	ACW--AGA-CATGAT---AGCAGCA--CA-CTAGC---ATCTA-TTG-A--TASCTGCCT	1091
Planta5	ACAT-AGA-CATGAT---AGCAGCA--CAGCTAGC---ATCTAKTTGTAY-TACSTGGCT	1100
Planta2	MMGTAAGA-CATGAT---AGCAGCA--CA-CTAGC---ATCTATTTG-AA-TASTTGCT	1105
Planta17	ACAT-AGA-CATGAY---AGCAKCA--CAC-TAGCC--ATCTAGTTG-AM-TASTTGCTA	1110
Planta20	ACGW-AGWRCATGAY---AGCAKM--CAC-TAGC---ATCTAGTTG-AC-TASTGGGCC	1106
Planta15	AMGT-ARGACATGAY---AGCATCA--CAC-TAGC---AWCTATTTG-AW-TASTTGMC	1106
Planta13	ACAT-AGA-CATGAY---AGCAKCA--CACCTAGC---ATCTAKTTGKAY-TASTTGCT	1105
Planta16	MCAT-ARM-MATGAY---AGCAYMC--CACCTAGC---ATCTWGTTTGAM-TASTTTGMC	1102
Planta23	MCAK-ACA-YRTKAT--CAGCARTMACTACKCAGCCWYATTWTGTTGTA--CWYTK-GST	1133
Planta24	MCAR-WAC-AAYGATAAYAGCATCAMCTWMSWRATCCWMTWTGKTTTAAAMYATTGTGCT	1154
Planta6	CGAT-----CATGTG---ACAGCA--TACTAGCT--AKCACTT-----	985
Planta21	CGA-----CATGCT---RCAGCA--TACTA-----	1014
Planta9	GCGT-----MGTST-----RY-GCA--TACTAGC---AKCACAKCGACTASTCT-----	1031
Planta7	CGAW-----CGCGWG---AC-GC---TMMTG--C--AKC-----	996
Planta10	CATW-----CAAGCT---GCTTC-----	974
Planta25	CAGT-----CAYG-----	887

Planta1	---TGACAAG--AAG---T-ATCT---AAG-TA-GC-KT-ASAG--TYTWA-GCCTGCCT	1146
Planta4	-----GMA--GAG---T-ATCT---AAGGTA-SC-TA-GCA---TYTA-GCTGGC--	1132
Planta18	---TG--MAG--AAG---T-ATCT---AG--TA-GC-TA-ASCA--GTTTA-GCT-GC--	1137
Planta3	---TGACAAG--AAG---TTATTC---TAG-TA-SC-KAAGCAG--TYTWA-GCT-GC--	1141
Planta11	---TG--MAG--GAG---TTATTY---AGG-TA-SK-TA-GCAG--TYTTAAGCT-GC--	1129
Planta5	---TG--CAT--GAG---TAATCT---AGG-TA-GC-TGAGCA---TCTAAGCT-GC--	1137
Planta2	---TTRMAAG--AAG---TTATYT---AG--TA-SC-TAAGCAG--TTTWA-GCT-GC--	1144
Planta17	---TR--CA---GAG--T--ATCT---A-G-TA-GCTKAMGCAG---TCTTAGCTGGC-T	1148
Planta20	---TG--MAT--GAG--TTAATCA---A-G-TA-RCGTA-GCAG---TYTAAGCTGGC-T	1146
Planta15	---TAGACAA--GAG--T--ATCT---A-GGTA-RC-TAAGCAG---TCTAGGCTGGC-T	1147
Planta13	---TR--CA---GAG--TTAATCT---AAGGTAAGCTTACGCA---TCTAAGCTGCC-T	1147
Planta16	---TTRRCOA--GAAGTTTAWTCT---A--GTAAGCGTAACSAG---TCTAAGCTGGC-T	1148
Planta23	YKCTW-GCAA-TGAG---TTATTC---AGGTTG-ACAKGCACMT-TGTCYA---TAG---	1177
Planta24	GTCTATGCAAATGAT---TTATTTCCAAGGTTA-AMTGAGMSACATGTCTA---TAGG--	1205
Planta6	-----	
Planta21	-----	
Planta9	-----	
Planta7	-----	
Planta10	-----	
Planta25	-----	

Planta1	TGGCA-TGCA-TGAT-TGTAACMGG-TA-CG-TACTGATACGTGCAACGATCCYCTGT	1198
---------	--	------

Planta4	TSGC--TGCA-GTAT-TG-AACCGGATA-CGCTMCTGATGAKCTCGAC-----	1174
Planta18	TGGCA-TGCA-TGAG-TT--ACAGG-TA-AGGTMC-GGTGA-----	1170
Planta3	TGGCA-TS-A-TGAT-TG-AACAGGCTAAGGCMWCCCTGAAATCAYGC-----	1184
Planta11	TTGCA-TG-A-GTAT-TG-AACAG-CTAACGCTACT---GAATMGTGC-----	1168
Planta5	-TGCA-TGCAGTAAT-TTTAACGAG-----G-----	1160
Planta2	-TGCA-TGCATGTAT-TG-AACAGTAAAGCGCTMC--AKGGATTG-----	1183
Planta17	--GCA-TGCAGGTAT-TG---TTGAS---CGAGGCTATACGGCTTW-----	1184
Planta20	TGGCA-TSCAGTGAT-TT---TAGAC---CAG-----	1170
Planta15	-GGCA-TGCAGTGAA-TT---TTSAGACACAG-----	1173
Planta13	--GCA-TGCAAGTAT-TT---CTAAG---CRAG-CTATACGGMT-----	1180
Planta16	GGCCACKGCAATGATGTG---TAGAG-----	1171
Planta23	---CATTGTG--CGT-TK-----CGCACT-----	1195
Planta24	---CCTTKCG--T-T-YG-----CG-----	1218
Planta6	-----	
Planta21	-----	
Planta9	-----	
Planta7	-----	
Planta10	-----	
Planta25	-----	

4. Protocolo de extração de RNA usando Trizol

- 1) Pesar o material vegetal em papel-alumínio e fechá-lo imediatamente, mergulhando em nitrogênio líquido. Quanto mais fresco o material, melhor o resultado.
- 2) Colocar o material no cadinho, junto com o N₂, e pulverizá-lo com auxílio de um pistilo até ficar pó (inicialmente, pode auxiliar a maceração com o fundo do cadinho). Nunca deixar o material sem nitrogênio.
Acrescentar nitrogênio durante todo o processo para evitar oxidação do material. Usar espátulas ou bisturi para soltar o material da parede do cadinho (já ir tombando o cadinho para concentrar o material).
O cadinho pode ser substituído pelo eppendorff e por pistilos azuis de plástico, mas isso não é recomendável.
- 3) Colocar o material pulverizado rapidamente em eppendorff ou falcons e após isso colocar trizol, com 6 mL para cada grama de tecido e homogeneizar o material. No caso, por exemplo, de 0,2 gramas, coloca-se 1 mL de TRIZOL.
- 4) Colocar no vórtex por 5 minutos em temperatura ambiente e depois em um homogeneizador.
- 5) Adicionar 200 microlitros de clorofórmio (temp. ambiente) no eppendorff (0,2 mL para cada 1 mL de TRIZOL).
- 6) Agitar o tubo vigorosamente na mão, por 15 segundos e, incubar à temperatura ambiente por 3 minutos.
- 7) Centrifugar por 10.000 RPM por 10 minutos a 4 °C, em centrífuga de mesa refrigerada.
- 8) Após a centrifugação, devem-se observar 3 fases diferentes no tubo. Coletar a superior (aquosa) e transferir para um tubo FALCON ou eppendorff de 15 mL para determinar o volume final (Pode ser necessário repetir o processo com lavagem de clorofórmio para limpar melhor a amostra, que deve estar clara, transparente).

- 9) Coletar preferencialmente 1 mL da amostra, ou 400 microlitros, em eppendorff estéril, onde serão colocados 600 microlitros de isopropanol (temperatura ambiente). Misturar por inversão 20 vezes e deixar em temperatura ambiente por 10 minutos.
- 10) Centrifugar 10.000 RPM por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C.
- 11) Descartar sobrenadante com cuidado, pois o pellet descola do fundo do tubo.
- 12) Colocar 1 mL de etanol a 75% gelado feito com água DEPC (Especial para RNA), misturar no vórtex por alguns segundos e centrifugar 6.000 RPM por 5 minutos a 4°C. Descartar sobrenadante com cuidado e deixar secar ao ar por vinte minutos. Este processo pode ser substituído pelo uso do Speed vacum, na condição de dessecador de substâncias alcoólicas (D-AL, concentrator plus – eppendorff).
- 13) Suspende o pellet em 30 microlitros de água DEPC (0,01%) em vórtex (melhor pipetar até o máximo de 100 vezes). Vortexar por 15 minutos, no mínimo. Tudo isso porque o pellet de RNA demora para se ressuspender. Tem que raspar bem as paredes com as ponteiras para se aproveitar o RNA.
- 14) Correr o gel até 130 V (pode ser alto para evitar a degradação do RNA), com 1 % de agarose. Quanto à cuba e aos demais componentes usados, se passíveis de contaminação, devem ser lavados com água oxigenada a 10% ou NaOH 0,1 M.
- 15) Obs: Todo o procedimento que envolver trizol e isopropanol deve ser realizado com máscara respiratória.

5. Síntese de cDNA a partir do RNA

Síntese de cDNA usando Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Podem ser usados RNA de 100 a mais de 12 Kb. A amostra deve ser de 1 pg (picograma) até 5 µg (5.000 ng) de RNA. A superscript III transcriptase reversa é uma versão da M-MLV RT engenheirada para reduzir a atividade da RNase H e promover uma estabilidade térmica. É usada para síntese de cDNA a temperaturas de 42-55 °C.

Procedimento:

Utilizamos então 3 µg (300 ng) de RNA das amostras (equilibradas de acordo com a quantidade de RNA presente por µl calculado pelo nanodrop).

- 1) Misture e dê um spin curto para cada componente antes de usar. Colocar tudo no gelo.
- 2) Combine os reagentes em um primeiro tubo (1,5 mL).

Componente	Quantidade
até 5 µg de RNA	x
500 µM oligo dt	1 µl
10 nM dNTP mix	1 µl
DEPC water	Completar até 10 µl

- 3) Incubar a 65 °C por 10 minutos e logo colocar gelo (5 min).
- 4) Preparar o cDNA mix em um segundo eppendorff, com os seguintes reagentes, seguindo a ORDEM:

Componente	Quantidade
10 x RT buffer	2 µl
25 nM MgCl₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT (40u/µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 u/µl)	1 µl
Total reação	10 µl

Colocar tudo no gelo.

- 5) Colocar o mix 2 (etapa 4) no tubo 1 (etapa 2), misturar suavemente com pipeta (5 vezes) e dar um spin muito breve. Incubar a 50°C por 50 minutos.
- 6) Terminar a reação com 85 °C por 5 minutos. Logo colocar no gelo por 1 a 2 minutos.
- 7) Dar um spin breve. Adicionar 1 µl de RNase H no eppendorff e incubar por 20 minutos a 37 °C. Produto final de 20 µl.
- 8) Quantificar no Nanodrop (opcional = gel).
- 9) Armazenar a -20°C ou usar diretamente no PCR.

Como no Nanodrop obtivemos as concentrações diferentes de RNA, tivemos de equilibrá-las para fazer o cDNA.

	R11	R12	R21	R22	R31	R32	R41	R42
ng/µl	127	216	54	343	132	115	84	50
para 300	2,4	1,4	5,5	1	2,3	2,6	3,6	2

	S11	S12	S21	S22	S31	S32	S41	S42
ng/µl	56	121	214	254	37	46	27	48
para 300	5,4	2,5	1,4	1,2	8,1	3,1	11,1	6,3

Assim, nossas amostras foram de:

Mix 1:

RNA mix	R11	R12	R21	R22	R31	R32	R41	R42
RNA (µl)	2,4	1,4	5,5	1	2,3	2,6	3,6	2
50 nM oligo	1	1	1	1	1	1	1	1
10 nM dNTP	1	1	1	1	1	1	1	1
DEPC H ₂ O	5,6	6,6	2,5	7	5,7	5,4	4,4	6
Total	10	10	10	10	10	10	10	10

RNA mix	S11	S21	S21	S22	S31	S32	S41	S42
RNA (µl)	5,4	2,5	1,4	1,2	8,1	3,1	11,1	6,3
50 nM oligo	1	1	1	1	1	1	1	1
10 nM dNTP	1	1	1	1	1	1	1	1
DEPC H ₂ O	2,6	5,5	6,6	6,8	0	4,9	0	1,7
Total	10	10	10	10	10,1	10	13,1	10

Mix2:

cDNA mix	R11	R12	R21	R22	R31	R32	R41	R42
10x Rt Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2
25 nM Mg ²⁺	4	4	4	4	4	4	4	4
0,1M DTT	2	2	2	2	2	2	2	2
RNAse out	1	1	1	1	1	1	1	1
SS III	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	10	10	10	10	10	10	10	10

cDNA mix	S11	S21	S21	S22	S31	S32	S41	S42
10x Rt Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2
25 nM Mg ²⁺	4	4	4	4	4	4	4	4
0,1M DTT	2	2	2	2	2	2	2	2
RNAse out	1	1	1	1	1	1	1	1
SS III	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	10	10	10	10	10	10	10	10

6. Purificação de DNA com Resina

QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol

- 1) Processar no máximo 250 mg de Agarose.
- 2) Adicionar 300 µL Buffer Qx1 para cada 100 mg de gel
- 3) Vortexar o QIAEXII (resina) por 30 segundos, logo adicionar 10 µL no tubo.
- 4) Incubar a 50°C por 10 minutos (Vortexando a cada 2 minutos). Ao final, a cor deve ser amarela.
- 5) Centrifugar a 12.000 RPM por 1 minuto. Remover sobrenadante e depois pipetar 200 µL, dar spin e pipetar 20 µL.

- 6) Adicionar 500 µL Buffer QX1 e vortexar para lavar o pellet.
- 7) Centrifugar a 12.000 RPM por 30 segundos. Remover sobrenadante e tirar os restos com pipeta.
- 8) Para lavar o pellet, adicionar 500 µL Buffer PE, vortexar. Centrifugar a 12.000 RPM, 30 segundos, remover sobrenadante.
- 9) Repetir passo 8.
- 10) Secar pellet entre 15 e 30 minutos.
- 11) Eluir pellet com 20 µL de água, vortexar. Incubar.
- 12) Centrifugar a 12.000 RPM por 30 segundos. Pegar sobrenadante com DNA em tubo novo.
- 13) Fazer gel com 5 µL do sobrenadante.

7. Alelos encontrados em biótipos de capim-amargoso

PLANTA#1

Alelo1

```
>GCTGTAGGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCCGGTTGAGAAGGATGCCAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGG
GGAATGCTGGAAGTGAATGCGTCCATTGACAGCGGCCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTG
ATGGGGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATGTTG
ATTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGC
TGTCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGA
TTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTGCAAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGA
AAGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTACATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGCAT
ATGTACAGGGTCATGCCTCAAGTGCAGCTATTTCTTGGCAATACCCATCAAGCACATAATTGATTTTCAGAGACA
GTCACGGACTCCAACGGACGCATTGCCTTCCAGCAGTCCAGAAGAGCTGCACTTCCTCTTTGGCTCCTTCTCAG
GAACTTGCCACCACTGCCAACGACTACAGCTT
```

2 aminoácidos codificantes para suscetíveis.

```
LIVVGCGKFPVEKDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVDC
FLGTDCPPVRIKIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKA
EHSDSWDRFYIKGGQKYKSPKNAYVQGHASSASYFLAIPKHIIDFRDSHGLQRTCLPAVQKSCSSSLAPSHGT
CHHCQRLQL
```

Alelo2

```
>GCTGTAGGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCCGGGATGGCGGAGTGCCAAGAGGGAAGTGCAGCTCTTCTTGG
GGAATGCTGGAAGTGAATGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTG
ATGGGGTACCGAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTG
ATTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGC
TGTCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGA
TTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTGCAAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGA
AAGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGCAT
ATGTGGAAGGTGATGCCTCAAGTGCAGCTATTTCTTGGCAATACCCATCAAGCACATAATTGATTTTCAGAGACA
GTCACGGACTCCAACGGACGCATTGCCTTCCAGCAGTCCAGAAGAGCTGCACTTCCTCTTTGGCTCCTTCTCAG
GAACTTGCCACCACTGCCAACGACTACAGCTT
```

2 aminoácidos resistente:

```
LIVVGCGKFPWRSKREVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVDC
FLGTDCPPVRIKIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKA
EHSDSWDRFYIKGGQKYKSPKNAYVEGDASSASYFLAIPKHIIDFRDSHGLQRTCLPAVQKSCSSSLAPSHGT
CHHCQRLQL
```

PLANTA#2

Alelo1

```
>GCTGTAGTCGTTGGCTGTGGTGGAAACCTTATTATTGTGGAGGAGGGCAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGG
GAATGCTGGAAGTGAATGCGTCCATTGACAGCGGCCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGA
TGGGGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATGTTGA
TTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGCT
```

GTCTGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGAT
TGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGAA
AGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGACAAAATACAAGTCCCCTAAAAATGCTAT
GTGGAAGGTGATGCCTCAGGCGAGCTATTTCTTGACAGATCCATCAAGCACATAATTTATTTCTCGAGCAGTATCA
CCTACTTTAATGGACGCACTGCACTCCCGCATCCACGAAGCTCCACTCCTCTTCGTTCCCTCATTCGGAG

1 aminoácido suscetível e um resistente

AVVVGCGGNLIIVEEGKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVD
CFLGTDCPPVRIKIGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVK
AEHSDSWDRFCIKGGQKYKSPKNAMWKVMPQASYFLQIHQAHLNFLEQYHLLWTHCTPASTKLHSSSFLIR

Alelo2

>GCTGTAGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCCGGTTGAGAAGGATGCCAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGG
GAATGCTGGAACGGCAATGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGA
TGGGGTACCGAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGA
TTGTTTCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGCT
ATCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGAT
TGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGAA
AGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGACAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGCTAT
ATGAAAGGTGATGCCTCAGGCGAGCTATTTCTTGACAGATCCATCAAGCACATAATTTATTTCTCGAGCAGTATCA
CCTACTTTAATGGACGCACTGCACTCCCGCATCCACGAAGCTCCACTCCTCTTCGTTCCCTCATTCGGAG

2 aminoácidos resistente

AVVVGCGGKFPVEKDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVD
CFLGTDCPPVRIKIGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVK
AEHSDSWDRFCIKGGQKYKSPKNAIKVMPQASYFLQIHQAHLNFLEQYHLLWTHCTPASTKLHSSSFLIR

PLANTA#3

Alelo1

>GGTGGTGCAAGTGCTGATGGCGAGAGATGCCAAGAGGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGA
ATGCGTCCATTGACAGCGGCCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCAAGAATG
AGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATGTTGATTGTTTCTTGGCACT
GACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGCTGTCTGGTTCCATCAGC
AGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAA
CTAATCTCCATTCCCTATGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGAT
AGCTGGGACAGGTTCTACATCAAGGGAGGTCAAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGCATATGAACC

2 aminoácidos suscetíveis

WCKCLMARDAKREVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTD
CPPVRIKIGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDS
WDRFYIKGGQKYKSPKNAYE

Alelo2

>GGTGGTGCAAGTTCCCGGTGGAGAAGGATGCCAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGA
ATGCGTCCATTGACAGCGGCCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATG
AGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTTTCTTGGCACT
GACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGCTGTGAGGTTCCATCAGC
AGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAA
CTAATCTCCATTCCCTATGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGAT
AGCTGGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTCCCCTAAAAATGCATATGAACC

1 aminoácido suscetível e um resistente

WCKFPVEKDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADVDCFLGTD
CPPVRIKIGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVKAHSDS
WDRFCIKGGQKYKSPKNAYE

PLANTA#4

Alelo1

>AGCTGTAGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTCATTAGACGGGGAAGATGCCAAGAGGGAAGTGCAGCTCTTCTTGG
GGAATGCTGGAAGTGAATGCGTACATTGACAGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTG

ATGGGGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATGTTG
 ATTGTTTCCCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGC
 TATCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGA
 TTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTGCAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGA
 AAGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTCCCCTAAAAATGCAT
 ATGAATC

2 aminoácidos resistentes

AVVVGCGKSLDGEDAKREVQLFLGNAGTAMRTLTA AVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADV
 CFLGTD CPPVRIKGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVK
 AEHSDSWDRFCIKGGQKYKSPKNAYE

Alelo2

>AGCTGTAGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCCGGTCGAGAAGGATGCCAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGG
 GGAATGCTGGAACGGCAATGCGTCCATTGACAGCGGCCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTG
 ATGGGGTACCGAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTG
 ATTGTTTCCCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGC
 TGTCTGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGA
 TTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTGCAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGA
 AAGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTACATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGCAT
 ATGAATC

2 aminoácidos suscetíveis

AVVVGCGKFPVEKDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTA AVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADV
 CFLGTD CPPVRIKGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGVK
 AEHSDSWDRFYIKGGQKYKSPKNAYE

Alelos de plantas suscetíveis

Planta#1

>ATAGTAGTAGTCGTTGTCTGTGGTGGCAACTTGCCGGCGGAGAAGGATGAGCAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTT
 GGGGAATGCTGGGACTGCAATGCGTCCATTGACGGCTGCTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCT
 TGATGGGGTACCGAGAATGAGGGAGAGACCCATTGGTGACCTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGT
 TGATTGTTTCCCTTGGCACTGACTGTCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAA
 GCTATCTGGTTCGATCAGCAGTCAATACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGTGATGTGGA
 GATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTTGAAATGACATTGAAATTGATGGAGCGTTTTGGCGT
 GAAAGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTTTACATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGC
 ATATGAAGCC

IVVVVCGGNLPAEKDEQEEVLLFLGNAGTAMRPLTA AVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADV
 DCFLGTD CPPVRIKGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLKLIMERFGV
 KAEHSDSWDRFYIKGGQKYKSPKNAYEA

Planta#2

>AATATAGTGTGTGGGTGGCGTTGAGTAGGATGCCAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGGACTG
 CAATGCGTCCATTGACGGCGGCTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTGCCGAGAA
 TGAGGGAGAGACCCATTGGYGACCTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTGGGGGCGGATGTTGATTGTTTCCCTTGGCA
 CTGACTGCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGCTATCTGGTTCCATCA
 GCAGTCAATACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCKGCTCCTTTAGCTCTTGGKGATGTGGAGATTGAGATCATTGATA
 AACTAATCTCCATTCCCTATGTTGAAATGACATTGAAATTGATGGAGCGTTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTG
 ATAGCTGGGACAGGTTTTACATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGCATATGAAGCC

ICVGGVEDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTA AVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIXDLVVGLKQLGADVDCFLGTD
 PPVRIKGIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMXAPLALXDVEIEIIDKLISIPYVEMTLKLIMERFGVKAHSDSW
 DRFYIKGGQKYKSPKNAYEA

Planta#3

>CAATGCTGTAGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCCGGTTGAGAAGGATGCCAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCT
 TGGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGTCCATTGACAGCGGCCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGC
 TTGATGGGGTACCGAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATG
 TTGATTGTTTCCCTTGGCACTGACTGCCCACCTGTTTGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTA

AGCTGTCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGATGTGG
AGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGCG
TGAAAGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTACATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATG
CATATGAAATACC

NAVVVGCGGKFPVEKDAKEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGADV
DCFLGTDCPPVCIKIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERFGV
KAEHSDSWDRFYIKGGQKYKSPKNAYEI

Planta#4

>TTTCCAATAGCTGTAGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGGCGTCGTACGACGAGGAGGGCCAAGAGGAAGTGCAGCT
CTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGTCCATTGACAGCGGCCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTA
TGTGCTTGATGGGTTACCAAGAATGAGGGAGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTGCGATTGAAACAGCTGGGCGC
GGATGTTGATTGTTTCCCTTGGCACTGACTGCCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAA
GGTTAAGCTGTCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTAGCTCTTGGGGA
TGTGGAGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTT
TGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGATAGCTGGGACAGGTTCTACATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAA
AAATGCATATGAAATTCC

FPIAVVVGCGGKASYDEEGQEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLKQLGA
DVDCFLGTDCPPVRIKIGGLPGGKVKLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRLMERF
GVKAEHSDSWDRFYIKGGQKYKSPKNAYEI

8. Desenho de primers para qPCR

aR1	-----GCTGTAGGTCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCTCGGATGGCGGAG-TGCCA	50
aR3	-----AGCTGTAG-TCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTCATTAG-ACGGGGAAGATGCCA	50
aS3	TTTCCAATAGCTGTAG-TCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCTCGG-TTGAGAAGGATGCCA	58
aR2	-----GCTGTAG-TCGTTGGCTGTGGTGGCAAGTTCCTCGG-TTGAGAAGGATGCCA	49
aS1	-----ATAGTAGTAG-TCGTTGTCTGTGGTGGCAACTTGCCGG-CGGAGAAGGATGAGC	52
aS2	-----AATA-TAG-T---GTGTG-GGTGGC-----G-TTGAGTAGGATGCCA	35
	*** * * ** *	
aR1	AGAGGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGTACATTGACAGCGG	110
aR3	AGAGGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGTACATTGACAGCGG	110
aS3	AAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGTCCATTGACAGCGG	118
aR2	AAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAACGGCAATGCGTACATTGACAGCGG	109
aS1	AAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGGACTGCAATGCGTCCATTGACAGCGG	112
aS2	AAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGGACTGCAATGCGTCCATTGACAGCGG	95
	* ***** *	
aR1	CTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGG	170
aR3	CTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCAAGAATGAGGG	170
aS3	CCGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCAAGAATGAGGG	178
aR2	CTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGG	169
aS1	CTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGG	172
aS2	CTGTGACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGGGTACCGAGAATGAGGG	155
	* ***** *	
A		
aR1	AGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTT	230
aR3	AGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATGTTGATTGTT	230
aS3	AGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATGTTGATTGTT	238
aR2	AGAGACCAATTGGCGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTT	229
aS1	AGAGACCAATTGGTGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGTGCGGATGTTGATTGTT	232
aS2	AGAGACCAATTGGTGACCTGGTTGTCGGATTGAAACAGCTGGGCGCGGATGTTGATTGTT	215
	***** *****	
aR1	TCCTTGGCACTGACTGCCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCA	290
aR3	TCCTTGGCACTGACTGCCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCA	290
aS3	TCCTTGGCACTGACTGCCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCA	298
aR2	TCCTTGGCACTGACTGCCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCA	289
aS1	TCCTTGGCACTGACTGTCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCA	292
aS2	TCCTTGGCACTGACTGCCCCACCTGTTTCGTATCAAGGGGATTGGAGGGCTACCTGGCGGCA	275

```
aR1      AGGTTAAGCTGTCTGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTC 350
aR3      AGGTTAAGCTATCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTC 350
aS3      AGGTTAAGCTGTCTCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTC 358
aR2      AGGTTAAGCTATCAGGTTCCATCAGCAGTCAATACTTGAGCGCCTTGCTGATGGCTGCTC 349
aS1      AGGTTAAGCTATCTGGTTCGATCAGCAGTCAATACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTC 352
aS2      AGGTTAAGCTATCTGGTTCATCAGCAGTCAATACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCKGCTC 335
*****
```

```
aR1      CTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATG 410
aR3      CTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATG 410
aS3      CTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATG 418
aR2      CTTTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATG 409
aS1      CTTTAGCTCTTGGTGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATG 412
aS2      CTTTAGCTCTTGKGATGTGGAGATTGAGATCATTGATAAACTAATCTCCATTCCCTATG 395
*****
```

```
aR1      TCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTGGCGTGAAGCAGAGCACTCTGATAGCT 470
aR3      TCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGATAGCT 470
aS3      TCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGATAGCT 478
aR2      TCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGATAGCT 469
aS1      TTGAAATGACATTGAAATTGATGGAGCGTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGATAGCT 472
aS2      TTGAAATGACATTGAAATTGATGGAGCGTTTGGCGTGAAAGCAGAGCACTCTGATAGCT 455
*****
```

```
aR1      GGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGC-ATATGTG 529
aR3      GGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTCCCCTAAAAATGC-ATATG-- 527
aS3      GGGACAGGTTCTTACA TCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGC-ATATG-- 535
aR2      GGGACAGGTTCTGCATCAAGGGAGGACAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGCTATATG-- 527
aS1      GGGACAGGTTTTTACA TCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGC-ATATG-- 529
aS2      GGGACAGGTTTTTACA TCAAGGGAGGTCAAAAGTACAAGTCCCCTAAAAATGC-ATATG-- 512
*****
```

9a. Conferência da variância do gene endógeno de Actina

Repetição 1			Repetição 2		
Resistent1-1	Act	23.9563637	Resistent1-2	Act	24.2807732
Resistent2-1	Act	24.4946499	Resistent2-2	Act	24.8389969
Resistent3-1	Act	24.4356575	Resistent3-2	Act	24.7570686
Resistent4-1	Act	24.2337856	Resistent4-2	Act	24.0005817
Susceptible1-1	Act	24.2944927	Susceptible1-2	Act	24.0319824
Susceptible2-1	Act	23.9214325	Susceptible2-2	Act	23.8350182
Susceptible3-1	Act	23.637989	Susceptible3-2	Act	24.8235836
Susceptible4-1	Act	24.9380569	Susceptible4-2	Act	25.6133404
	Media	24.2390535		Media	24.5226681
	DP	0.40315981		DP	0.59520055

9b. Qualidade dos primers *EPSPS* e Actina

QUALIDADE DOS PRIMERS PELO BEACON DESIGNER – *EPSPs*.

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	5	Total Na ⁺ Concentration (mM)	332.84

Sense Primer: TGATGGAGCGTTTGGCGTGA

Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
21	61.44	52.38	1	-0.5	0.0	0.0

Anti-sense Primer: GCATTTTATAGGGGACTTGTA

Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	51.16	40	1	-0.5	0.0	0.0

QUALIDADE DO PRIMER Actina

Reaction Conditions:

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	5	Total Na ⁺ Concentration (mM)	332.84

Sense Primer: ATATGGCTCACACCATCACC

Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	55.34	50	2	-2.1	-2.5	-2.5

Anti-sense Primer: CAGGGAGAAGATGACCCAGAT

Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
21	56.82	52.38	2	-2.1	-2.0	-2.0