**CLONAGEM E ANÁLISE DO GENE CODIFICADOR DA
ENZIMA ACETOLACTATO SINTASE (ALS) EM
Amaranthus quitensis e *Bidens pilosa*.**

ADRIANO REIS LUCHETA
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. HELAINE CARRER

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de Concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Junho – 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Lucheta, Adriano Reis

Clonagem e análise do gene codificador da enzima acetolactato sintase (ALS) em
Amaranthus quitensis e *Bidens pilosa* / Adriano Reis Lucheta. – Piracicaba, 2004.
101 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Aminoácidos 2. Caruru 3. Clonagem 4. Herbicidas 5. Inibidores de enzimas 6.
Picão-preto 7. Plantas daninhas 8. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 632.58

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

Aos meus avós, meus pais José Roberto e Maria Virgínia, minha irmã Isabela e
minha namorada Carolina,

DEDICO

“A boa madeira não cresce com
sossego; quanto mais forte o
vento, mais fortes as árvores.”

J. Willard Marriott

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente:

Aos meus pais, José Roberto Lucheta e Maria Virgínia Reis Lucheta, minha irmã Isabela Reis Lucheta, minha família e minha namorada Carolina Montewka Melotto, por todo suporte, principalmente nos momentos mais difíceis;

À Profa. Dra. Helaine Carrer pela orientação, confiança e oportunidade para a realização deste trabalho;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos oferecida durante o projeto;

Ao Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pela co-orientação e ensinamentos na área de fitotecnia e aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal;

Aos amigos do CEBTEC, Prof. Dr. Otto J. Crocomo, Prof. Luiz Antônio Gallo, Prof. Murilo Melo, Antônio F. C. Amaral, Ênio Thiago de Oliveira, Maria Solizete G. Silva, Valentina de Fátima De Martin, Carlos Ragassi, Keini Dressano, Judite Bonifácio e todos os que eu não tenha citado, pela cooperação, amizade e convivência;

Aos amigos Luiz Carlos Roma Jr., Henrique Sérgio Alves, Danila Montewka Melotto-Passarin, Simone Guideti Gonzalez, Nelson Arno Wulff, Irving Joseph Berger, Valesca Pandolfi, Tercílio Calsa Jr. e Maria Clara Pestana Calsa, por todos os momentos convvidos, alegrias e aprendizado;

Ao Dr. Elias Melotto (in memorian) pelo exemplo como ser humano, confiança e estímulo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Mercado agrícola.....	4
2.2 Resistência de plantas daninhas a herbicidas.....	6
2.3 Cronologia da resistência.....	9
2.4 Enzima Acetolactato sintase.....	10
2.4.1 Biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina....	11
2.5 Cofatores.....	13
2.5.1 Tiamina difosfato (ThDP).....	13
2.5.2 Íon metálico.....	14
2.5.3 Flavina adenina dinucleotídeo (FAD).....	14
2.6 Aspectos genéticos e moleculares da ALS.....	15
2.6.1 Bases moleculares da resistência.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Material vegetal.....	25
3.2 Determinação da curva dose-resposta.....	26

3.2.1 Tratamentos com o herbicida.....	26
3.2.2 Análise estatística dos dados.....	28
3.3 Clonagem de segmentos do gene que codifica a enzima ALS.....	29
3.3.1 Isolamento de DNA total para clonagem do gene da ALS.....	29
3.3.2 Amplificação da região interna do gene que codifica a enzima ALS.....	29
3.3.3 Eletroforese e purificação dos fragmentos.....	31
3.3.4 Ligação dos fragmentos no vetor pUC 18.....	32
3.3.5 Preparo de células de <i>E. coli</i> competentes à transformação.....	32
3.3.6 Transformação de células de <i>E. coli</i> , linhagem DH5a por choque térmico.....	33
3.3.7 Seleção dos transformantes e extração do DNA plasmidial das bactérias.....	34
3.3.8 Reação de seqüenciamento.....	34
3.3.9 Bioinformática.....	36
3.4 Obtenção das extremidades 5' e 3' do gene da ALS.....	36
3.4.1 Extração de RNA total.....	37
3.4.2 Amplificação das extremidades 5' e 3' do gene da ALS.....	38
3.5 Clonagem e seqüenciamento do gene completo da ALS.....	39
3.6 Clonagem do gene da ALS no vetor binário pCAMBIA 1302.....	41
3.7 Transformação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
3.7.1 Preparo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competente para transformação.....	42
3.7.2 Transformação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por choque térmico...	43
3.8 Transformação de plantas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Tratamento com o herbicida.....	46
4.1.1 Análises estatísticas.....	50
4.2 Análise da seqüência completa do gene que codifica a enzima ALS.....	52
4.2.1 Polimorfismo de nucleotídeos.....	54
4.3 Transformação de plantas de tabaco, via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	58
5 CONCLUSÃO.....	64
ANEXOS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. Fonte: Buchanan, (2000).....	12
2	Estrutura tridimensional da ALS em leveduras. Fonte: Pang et al.,(2002a).....	18
3	(a) Canal de acesso aos substratos, mostrando a ThDP. (b) Canal de acesso aos substratos bloqueado pelo chlorimuron ethyl. As superfícies estão coloridas em azul (domínio α), amarelo (domínio β) e verde ("loop móvel" domínio γ). Fonte: Pang et al., (2003).....	22
4	Demonstração do crescimento de plantas de <i>A. quitensis</i> (a) e <i>B. pilosa</i> (b), 21 dias após a aplicação do herbicida chlorimuron ethyl. Os tratamentos são representados como: T1 (testemunha), T2 (8,0g.i.a./ha), T3 (80,0g.i.a./ha), T4 (800,0g.i.a./ha) e T5 (8000,0g.i.a./ha). Onde R (biótipos resistentes) e S (biótipos sensíveis).....	48
5	Porcentagem de controle dos biótipos resistentes e sensíveis de <i>A. quitensis</i> , 28 dias após a aplicação do herbicida Chlorimuron ethyl.....	49
6	Porcentagem de controle dos biótipos resistentes e sensíveis de <i>B. pilosa</i> , 28 dias após a aplicação do herbicida Chlorimuron ethyl.....	49

7	Cromatogramas demonstrando a alteração de nucleotídeos e aminoácidos. (a) Mutação na região do domínio B em <i>A. quitensis</i> . (b). Mutação no domínio B em <i>B. pilosa</i>	56
8	Representação esquemática do plasmídeo binário pAL58 e suas estruturas. A região descrita como ALS representa o ponto de inserção do gene da ALS dos biótipos resistentes e sensíveis de <i>A. quitensis</i> e <i>B. pilosa</i>	59
9	Digestão dos plasmídeos binários extraídos de colônias transformadas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Eletroforese em gel de agarose 0,8%, a 3,6 V/cm.....	60
10	Experimento de transformação de discos foliares de tabaco via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . (a). Inoculação dos discos foliares. (b). Regeneração de plantas de tabaco.....	61

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Comercialização de Defensivos Agrícolas no Brasil, por categoria em milhões de US\$.....	5
2	Espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil.	10
3	Principais substituições de aminoácidos, que conferem resistência aos herbicidas inibidores da ALS, encontradas em espécies daninhas.....	21
4	Tratamentos utilizados no teste com o herbicida Classic.....	27
5	Combinações de <i>primers</i> utilizados e respectivos fragmentos esperados.....	31
6	Resultados do teste de Tukey aplicado para a avaliação da significância dos tratamentos. Letras iguais ao lado dos tratamentos demonstram que estes não foram significativos ao nível de 1% de probabilidade de erro. Tratamentos acompanhados de letras diferentes foram considerados significativos ao nível de 1% de probabilidade. Os tratamentos estão representados como: T1 (testemunha), T2 (8,0g.i.a./ha), T3 (80,0g.i.a./ha), T4 (800,0g.i.a./ha) e T5 (8000,0g.i.a./ha). Onde R (biótipos resistentes), S (biótipos sensíveis) e G.L. (grau de liberdade).....	47
7	Parâmetros da equação Log-logística para determinação da curva dose resposta.....	51

8	Valores de GR_{50} para os biótipos resistentes e sensíveis de <i>A. quitensis</i> e <i>B. pilosa</i>	51
---	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D = 2,4 ácido diclorofenoxiacético

Å = Ângstron

BAP = 6-benzilaminopurina

cDNA = DNA complementar

D.O. = Densidade óptica

dNTP = Desoxirribonucleotídeo trifosfato

DEPC = dietil-pirocarbonato

FAD = Flavina Adenina Dinucleotídeo

g.i.a./ha = Gramas de ingrediente ativo por hectare

GFP = Proteína Fluorescente Verde ("Green Fluorescent Protein")

GR₅₀ = Dose responsável por 50% de controle

ha = Hectare

IPTG = Isopropylthio - β -galactoside

Kb = quilo bases

kDa = Quilo Dalton

lb/pol² = Libras por polegadas quadradas

NAA = Ácido naftaleno acético

NAD⁺ = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo em sua forma reduzida

NADH = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

pb = Pares de bases

PCR = Reação em cadeia da Polimerase ("Polimerase Chain Reaction")

rpm = Rotações por minuto

T-DNA = DNA de transferência

ThDP = Tiamina difosfato

U/ μ L = Unidades por microlitro

V/cm = Volts por centímetro

X-GAL = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

**CLONAGEM E ANÁLISE DO GENE CODIFICADOR DA ENZIMA
ACETOLACTATO SINTASE (ALS) EM *Amaranthus quitensis* e
*Bidens pilosa***

Autor: ADRIANO REIS LUCHETA

Orientadora: Profa. Dra. HELAINE CARRER

RESUMO

A enzima Acetolactato sintase é a enzima chave na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. A ALS foi identificada como alvo de ação de cinco classes distintas de herbicidas: sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidil-tiobenzoatos e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas. Estes herbicidas vêm sendo intensivamente utilizados no controle de plantas daninhas em diversos países,

levando ao surgimento de biótipos resistentes. Até hoje foram observadas 83 espécies resistentes aos herbicidas inibidores da ALS no mundo. Na América do Sul, foram identificadas as espécies *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Amaranthus quitensis* (caruru), no Brasil e na Argentina, respectivamente. Sementes destas espécies foram coletadas em lavouras de soja para ensaios biológicos e determinação da curva dose-resposta, confirmando a resistência e sensibilidade aos herbicidas inibidores da ALS. A sequência codificadora do gene da ALS de cinco plantas, dos biótipos resistentes e sensíveis, de ambas as espécies, foi amplificada por PCR, clonada em plasmídeos e sequenciada. Os resultados mostram que a sequência codificadora do gene da ALS em *A. quitensis* é composta por 2010 nucleotídeos tanto nos biótipos resistentes como nos sensíveis. Em *B. pilosa*, a sequência dos biótipos resistentes é composta por 1935 nucleotídeos e dos biótipos sensíveis é composta por 1959 nucleotídeos. Foi demonstrado que o fenótipo de resistência em ambas as espécies é determinado pela substituição do aminoácido Triptofano (W), nos biótipos sensíveis, pelo aminoácido Leucina (L), nos biótipos resistentes, na região denominada domínio B. Resultados semelhantes foram descritos em outras espécies. Plasmídeos binários contendo a sequência codificadora completa da ALS, de biótipos resistentes e sensíveis de *A. quitensis* e *B. pilosa*, foram construídos para a transformação de discos foliares de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*.

**CLONING AND ANALYSIS OF THE GENE THAT CODIFIES FOR THE
ACETOLACTATE SYNTHASE ENZYME of *Amaranthus quitensis* and
*Bidens pilosa***

Author: ADRIANO REIS LUCHETA

Adviser: Profa. Dra. HELAINE CARRER

SUMMARY

Acetolactate synthase (ALS) is the key enzyme in the biosynthesis of branched chain amino acids: valine, leucine and isoleucine. ALS has been identified as the site of action to five distinct classes of herbicides: sulfonylureas, imidazolinones, triazolopyrimidines, pyrimidinyl thiobenzoates and sulfonylamino-carbonyl-triazolinones. These herbicides have been used intensively to control weed plants in many countries, increasing the appearance of herbicide resistant biotypes. Until today, it has been observed eighty three ALS inhibitors herbicides resistant species in the world. In South America, resistant biotypes of *Bidens pilosa* (hairy beggarticks) and *Amaranthus quitensis*

(pigweed) were identified in Brazil and Argentina, respectively. Seeds of these species were harvested from soybean fields for bioassays and dose-response curve to confirm resistance and sensitivity to herbicides inhibitors of ALS. The coding region sequence of the ALS gene of five plants from resistant and sensitive biotypes of both species were amplified by PCR, cloned into plasmids and sequenced. The data shows that the *A. quitensis* coding region of the ALS gene is composed by 2010 nucleotides of both resistant and sensitive biotypes. In *B. pilosa*, the resistant biotype is composed by 1935 nucleotides and the sensitive one is composed by 1959 nucleotides. It was demonstrated that the resistance phenotype in both species is due to a Tryptophane (W) aminoacid exchange, in the sensitive ecotype, to a Leucine (L) in the resistant one, at the domain B region. Similar results has been described for others resistant species. Binary plasmids were constructed containing the complete codified ALS sequence of *A. quitensis* and *B. pilosa* of resistant and sensitive biotypes to transform tobacco leaves by *Agrobacterium tumefaciens*.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de herbicidas como método de controle de plantas daninhas nas culturas iniciou-se após a segunda guerra mundial. Esta prática simplificou enormemente o sistema de manejo de plantas daninhas, tornando desnecessárias algumas atividades como: aração com tração animal, queimadas, cobertura do solo e rotação de culturas, além de proporcionar também o aumento da produção sem o aumento da área cultivada.

No entanto, muitos produtores vêem a utilização de herbicidas como sinônimo de erradicação das plantas daninhas nas culturas, nestes casos, torna-se ineficiente apenas a aplicação de herbicidas em pré-emergência, exigindo aplicações sucessivas em pós-emergência durante o ciclo da cultura (Culpepper et al., 2000).

Estas aplicações sucessivas de herbicidas acabam aumentando o custo do controle das plantas daninhas e conseqüentemente, os custos de produção (Medlin & Shaw, 2000). Além disso, a utilização sucessiva de apenas um herbicida, ou grupo de herbicidas com o mesmo modo de ação, contribuem para o surgimento de plantas daninhas resistentes a este herbicida, ou ao grupo a que ele pertence.

Atualmente foram descritos, em todo o mundo, 287 biótipos de plantas daninhas resistentes à pelo menos um tipo de herbicida, sendo que a maior parte deles (83 biótipos) apresentam resistência aos herbicidas inibidores da enzima Acetolactato sintase (ALS). Segundo o International Survey Of Herbicide Resistant Weeds (ISHRW, 2004), foram descritas até hoje no Brasil 11 espécies de daninhas que apresentam biótipos resistentes a herbicidas, sendo 7 delas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS.

Esta classe de herbicidas foi desenvolvida com a finalidade de inibir a enzima Acetolactato sintase, envolvida na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada: valina, leucina e isoleucina. As principais classes químicas comerciais são: sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidil-tiobenzoatos e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (Yu, 2003).

Os herbicidas inibidores da ALS começaram a ser comercializados em 1982 (Tranel, 2002). Devido a sua extrema eficiência, utilização de apenas gramas por hectares, ao contrário dos demais herbicidas da época, usados em quilogramas por hectares, amplo espectro no controle de daninhas, baixa atividade residual no solo e ausência de toxicidade para mamíferos, esta classe de herbicidas tornou-se uma das principais utilizadas no mundo (Mazur & Falco, 1989).

Porém, após 5 anos do início da utilização desta classe de herbicidas, começaram a surgir os primeiros casos de resistência e, em 1998, o número de biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS superou o número de casos de resistência de todas as outras classes de herbicidas. Estudos

demonstraram que substituições únicas de aminoácidos foram suficientes para converter a enzima ALS de sensível para resistente aos herbicidas que atuam sobre sua inibição (Tranel, 2002).

No Brasil, um dos casos mais importantes de resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS, foi a identificação de biótipos resistentes de picão-preto (*Bidens pilosa*) nas áreas produtoras de soja, no Mato-Grosso do Sul. Casos semelhantes foram descritos na Argentina, porém devido ao surgimento de biótipos resistentes de caruru (*Amaranthus quitensis*) (Monqueiro, 2003).

Plantas resistentes a herbicidas vêm sendo utilizadas como uma importante fonte de recursos genéticos tanto para a utilização como marcadores seletivos na tecnologia do DNA recombinante (Andersson et al., 2003), (Kovar et al., 2002), bem como para a transferência da resistência à espécies comerciais, a partir das técnicas de transformação genética de plantas.

Este trabalho tem como objetivo a clonagem e análise do gene que confere resistência aos herbicidas inibidores da ALS em plantas de picão-preto (*Bidens pilosa*) e caruru (*Amaranthus quitensis*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mercado agrícola

Atualmente a agricultura brasileira vem se destacando no cenário mundial pelo sucessivo aumento da produção de grãos, e no cenário nacional, junto à pecuária, pela importância econômica, representado 10,2% do PIB nacional no ano de 2003 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2004). A produção de grãos no país, na safra 2002/2003, foi superior a 123 milhões de toneladas, sendo a maior de todos os tempos, ocupando uma área de quase 44 milhões de ha (Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB, 2004). As estimativas para a safra 2003/2004, realizadas até o terceiro levantamento da CONAB, em fevereiro de 2004, apontam uma colheita de grãos próxima a 131 milhões de toneladas, em uma área total cultivada de 47 milhões de ha.

Este expressivo aumento da produção de grãos nos últimos anos deve-se ao aumento da área cultivada, à adoção de novas tecnologias de cultivo e a maior utilização de insumos.

Segundo levantamento realizado pelo Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG, 2004), o Brasil ocupa atualmente o

oitavo lugar entre os países no consumo de defensivos agrícola, com média de 3,2Kg/ha.

Quanto ao mercado de defensivos agrícolas, o Brasil comercializou cerca de 1,952 bilhão de dólares no ano de 2002, sendo que 988 milhões apenas no mercado de herbicidas. O mercado de herbicidas no Brasil vem se mantendo praticamente estável desde 1996, como mostra a Tabela 1 (SINDAG, 2004).

Tabela 1. Comercialização de Defensivos Agrícolas no Brasil, por categoria em milhões de US\$

Ano	Inseticidas	Acaricidas	Fungicidas	Herbicidas	Outros	Total
1989	235	91	147	508	nd*	981
1990	273	93	171	547	nd*	1,084
1991	231	56	147	534	20	988
1992	195	64	145	516	28	947
1993	196	74	166	589	25	1,050
1994	300	91	211	776	26	1,404
1995	339	100	227	835	35	1,536
1996	376	92	276	1,005	43	1,793
1997	465	87	357	1,215	58	2,181
1998	583	114	428	1,367	68	2,560
1999	596	79	422	1,176	56	2,329
2000	690	66	380	1,301	64	2,500
2001	631	66	363	1,143	85	2,287
2002	468	72	360	988	64	1,952

Fonte: SINDAG, (2004). * Não determinado

Segundo Christoffoleti (2000), 45% de todo herbicida utilizado no Brasil está direcionado a cultura de soja, destacando-se o uso dos herbicidas inibidores da ALS pela sua eficácia e seletividade para a cultura.

Em um trabalho piloto, o IBGE (2004), realizou um levantamento do uso de agroquímicos na cultura de soja, no estado do Paraná, durante a safra

1998/1999. Foi observado neste estudo, a aplicação de 5996 toneladas de ingrediente ativo de agroquímicos sobre uma área total de 3.130.666 ha. A utilização de herbicidas foi de 4368 toneladas de ingrediente ativo sobre a área total de 3.054.066 ha, o que corresponde a uma média de 3,38Kg de ingrediente ativo/ha. Do total de herbicidas utilizados, 718 toneladas foram de ingredientes ativos dos herbicidas inibidores da ALS (imidazolinonas e sulfoniluréias), sobre uma área de 2.812.497 ha, o que corresponde a média de 0,255Kg de ingrediente ativo/ha. Diante desta comparação fica clara a eficiência desta classe de herbicidas, aplicada em apenas gramas/ha para total controle das plantas daninhas.

2.2 Resistência de plantas daninhas a herbicidas

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida por Heap, (1997), como a habilidade natural e geneticamente transmissível de alguns biótipos dentro de uma população de daninhas sobreviverem a tratamentos com herbicidas, que, sobre condições normais de uso, deveriam controlar eficientemente aquela população de plantas daninhas. Holt & LeBaron, (1990), definem uma planta daninha resistente como aquela que sobrevive e cresce normalmente quando aplicada uma dose efetiva do herbicida. Eles lembram também que, em geral, a resistência a doses normais efetivas de herbicidas não é difundida dentro da população de daninhas sem que haja pressão de seleção pelo herbicida. De acordo com Heap, (1997), é denominada resistência

cruzada quando um biótipo é resistente a dois ou mais herbicidas devido à presença de apenas um mecanismo de resistência e resistência múltipla quando o biótipo apresenta dois ou mais mecanismos de resistência distintos.

Segundo Christoffoleti, 2000, o conceito de tolerância está relacionado com a capacidade inata da espécie de sobreviver a aplicações de doses recomendadas de herbicidas, sem alteração em seu crescimento e desenvolvimento. Diferentemente, a susceptibilidade seria a incapacidade da planta sobreviver a doses recomendadas de herbicidas, resultando na alteração do seu crescimento e desenvolvimento.

Os mecanismos gerais que conferem resistência aos herbicidas são três: alteração do local de ação, metabolização do herbicida e compartimentalização (Vargas, 1999).

O mecanismo de alteração do local de ação ocorre quando existe a substituição de uma ou mais bases nitrogenadas na sequência de DNA, resultando na mutação da enzima, que tem o local de ação do herbicida modificado. Pequenas alterações na conformação da proteína podem resultar num grande efeito sobre a afinidade da molécula de herbicida (Betts et al., 1992).

No mecanismo de metabolização do herbicida, a planta resistente possui a capacidade de decompor a molécula de herbicida em compostos menos tóxicos antes da chegada do mesmo até o local de ação (Christoffoleti, 2000). As formas de metabolismo mais comuns são hidrólise ou oxidação, originando grupamentos adequados para a conjugação com glutatona (GSH) ou

aminoácidos. Estas formas estão presentes em plantas naturalmente tolerantes aos herbicidas.

O mecanismo de compartimentalização consiste na remoção da molécula de herbicida, previamente inativada pela conjugação com metabólitos da planta, para regiões como o vacúolo, de menor capacidade metabólica.

Christoffoleti (2000), descreveu algumas características relacionadas às plantas daninhas e aos herbicidas, que favorecem o surgimento e sustentação das populações resistentes sobre as susceptíveis. As características relacionadas às plantas são: frequência inicial do genoma resistente, adaptabilidade ecológica e banco de sementes. As características referentes aos herbicidas são: período residual longo e uso repetitivo do mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação.

Como medidas preventivas do surgimento da resistência, Christoffoleti, (2000), sugere: rotação de culturas, manejo de herbicidas, rotação de herbicidas, mistura de herbicidas e alteração de alguns tratos culturais. Diggle et al., (2003), sugerem que herbicidas utilizados em conjunto, além da rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, podem reduzir o desenvolvimento de biótipos resistentes. Hatcher, (2003), descreve a combinação de métodos físicos, culturais e biológicos, inclusive a utilização de fungos como método de controle de plantas daninhas.

2.3 Cronologia da resistência

O primeiro caso de resistência registrado na história aconteceu em 1952, com biótipos de *Daucus carota*, uma dicotiledônea, resistentes ao herbicida 2,4-D (2,4 ácido diclorofenoxiacético), em regiões na beira de estradas em Ontário, no Canadá. O segundo caso também envolveu este mesmo herbicida da classe das auxinas sintéticas, acontecendo em 1957, onde biótipos de *Commelina diffusa*, presentes na cultura de cana-de-açúcar no Havaí, também apresentaram resistência (ISHRW, 2004).

Atualmente foram descritos no mundo 287 biótipos resistentes à pelo menos um tipo de herbicida, dentre estes biótipos 172 espécies diferentes, sendo 102 dicotiledôneas e 70 monocotiledôneas (ISHRW, 2004).

Biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas já foram selecionados em 59 países, sendo os Estados Unidos, com 107, o país com o maior número de biótipos resistentes, seguido pela Austrália com 41 biótipos.

Classificando-se por modo de ação, os quatro mecanismos com maiores números de biótipos resistentes são: os herbicidas inibidores da ALS totalizando 83 biótipos, herbicidas inibidores do fotossistema II com 65 biótipos, herbicidas inibidores da ACCase (Acetyl-CoA carboxylase) com 33 biótipos e auxinas sintéticas com 24 biótipos (ISHRW, 2004). No Brasil, estão presentes 11 diferentes espécies contendo biótipos resistentes a algum tipo de herbicida, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil

Espécie	Nome comum	Ano	Modo de ação do herbicida
<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto	1993	Inibidor da ALS
<i>Bidens subalternans</i>	Picão-preto	1996	Inibidor da ALS
<i>Brachiaria plantaginea</i>	Capim-marmelada	1997	Inibidor da ACCase
<i>Cyperus difformis</i>	Tiririca	2000	Inibidor da ALS
<i>Echinochloa crusgallis</i>	Capim-arroz	1999	Auxinas Sintéticas
<i>Echinochloa crus-pavonis</i>	Capim-arroz	1999	Auxinas Sintéticas
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Amendoim-bravo	1992	Inibidor da ALS
<i>Fimbristylis miliacea</i>	Cominho	2001	Inibidor da ALS
<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém	2003	Inibidor da síntese de Glicinas
<i>Raphanus sativus</i>	Nabo ou Nabiça	2001	Inibidor da ALS
<i>Sagittaria montevidensis</i>	Sagitária	1999	Inibidor da ALS

Fonte: ISHRW, (2004)

2.4 Enzima Acetolactato sintase

A enzima acetolactato sintase (ALS, E.C. 4.1.3.18) apresenta duas diferentes classes, com funções metabólicas, especificidade de substrato e exigência de cofatores diferentes (Chipman, 1998). O primeiro grupo catalisa a primeira das quatro reações em comum na biossíntese dos aminoácidos essenciais de cadeia ramificada: valina, leucina e isoleucina, necessitando para isto, tiamina difosfato (ThDP), um íon metálico divalente (geralmente Mg^{2+}) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), (Buchanan et al., 2000). Esta função anabólica é encontrada em bactérias, fungos, algas e plantas, mas não em mamíferos, que devem ingerir estes aminoácidos em sua dieta (Duggleby & Pang, 2000). O segundo grupo desta enzima, não é dependente de FAD e é insensível a inibição pelos aminoácidos de cadeia ramificada. Segundo

Duggleby & Pang, (2000), sob certas condições fermentativas, esta acetolactato FAD-independente tem a habilidade de produzir 2,3 butanodiol, sendo esta via metabólica uma alternativa da célula para a manutenção da homeostase do pH, remoção do excesso de piruvato não usado na biossíntese e regulação da taxa de NADH:NAD^+ . O melhor exemplo estudado deste grupo é a enzima isolada da bactéria *Aerobacter aerogenes*, um tetrâmero de subunidades idênticas de 58 kDa e pH ótimo ácido (Chipman, 1998). Pang, et al., (2002b), cristalizaram a ALS FAD-independente proveniente da bactéria *Klasiella pneumoniae* e encontraram uma estrutura formada por quatro monômeros em cada unidade assimétrica, com uma resolução de difração de 2,6 Å.

2.4.1 Biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina

Neste trabalho, será caracterizada apenas a ALS FAD-dependente, devido a sua importância como alvo da ação de herbicidas comerciais.

Em sua ação anabólica (Figura 1), a ALS, ou acetohidroxiácido sintase (AHAS), catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato, formando acetolactato, na biossíntese dos aminoácidos valina e leucina, ou, a condensação de uma molécula piruvato com uma molécula de 2-cetobutirato, formando 2-aceto-2-hidroxibutirato, como primeiro passo na biossíntese do aminoácido isoleucina. Cada um destes produtos é convertido posteriormente

por outras três reações, catalisadas pelas enzimas acetohidroxiácido isômero reductase (KARI), dihidroxiácido desidratase e aminotransferase, resultando em valina e isoleucina. Na biossíntese da leucina, o precursor da valina 2- ceto- isovalerato é ainda convertido em uma série de 4 reações que utilizam as seguintes enzimas respectivamente: 2-isopropilmalato sintase, isopropilmalato isomerase, desidrogenase e aminotransferase (Duggleby & Pang, 2000).

Figura 1 - Biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. Fonte: Buchanan, (2000)

2.5 Cofatores

2.5.1 Tiamina difosfato (ThDP)

Em comum com diversas outras enzimas que catalisam a descarboxilação do piruvato (piruvato oxidase (POX), piruvato descarboxilase (PDC) e benzoilformato descarboxilase (BFDC)), a ALS também usa a tiamina difosfato (ThDP) como cofator (Pang et al., 2002a).

De acordo com Duggleby & Pang, (2000), o requerimento de ThDP pela ALS pode ser identificado baseado na presença de aminoácidos conservados, na seqüência de DNA da proteína, sem a necessidade de ensaios bioquímicos. Estes motivos conservados estão presentes em todas as famílias de enzimas dependentes de ThDP, iniciado geralmente com a trinca GDG (Glicina/Aspartato/Glicina) e terminando com NN (Asparagina/Asparagina), separados por 24 a 27 outros aminoácidos.

No entanto, estudos da estrutura tridimensional de enzimas dependentes de ThDP, realizados por Lindqvist et al., (1992), demonstraram que estes domínios não estão envolvidos com a região da tiamina, na coenzima, e sim, estão envolvidos com a ligação do íon metálico, que por sua vez, se ancora aos grupos fosfatos da ThDP.

2.5.2 Íon metálico

Como todas as enzimas dependentes de ThDP, a ALS também depende de um íon metálico divalente para sua atividade (Pang et al., 2002a). De acordo com Tse & Schloss, (1993), não existe especificidade do tipo de metal, podendo ele ser: Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} e excepcionalmente o Al^{3+} . Geralmente esta necessidade é satisfeita pelo Mg^{2+} , em concentrações entre 0,1 a 10 mM.

Segundo Duggleby & Pang, (2000), a função do metal é atuar como uma âncora que segura a ThDP pela coordenação de dois átomos de oxigênio dos grupamentos fosfato e duas cadeias laterais dos aminoácidos pertencentes ao resíduo de ligação da ThDP.

2.5.3 Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

Segundo Duggleby & Pang, (2000) a reação catalisada pela ALS não envolve oxidação nem redução, sendo uma razão não óbvia a dependência de FAD como cofator. Outro fator que intriga os pesquisadores é a ação catabólica da ALS independente de FAD.

Foi proposto por Pang et al., (2002a) que a dependência de FAD é um vestígio remanescente, que reflete a evolução da ALS de um ancestral como a piruvato oxidase (POX). Esta hipótese é reforçada pela similaridade da

seqüência de aminoácidos das duas enzimas, os tipos de reações catalisadas por elas e seus cofatores requeridos.

Estudos com mutantes de tabaco, realizados por Yoon et al., (2002), comprovaram que a alteração do aminoácido Lisina (K) pelo aminoácido Glutamina (Q) na posição 219, na seqüência de aminoácidos da ALS, torna a enzima totalmente inativa sob várias condições de ensaios. Análises de absorbância demonstraram que o mutante havia abolido a afinidade pela ligação com a FAD e conseqüentemente sua atividade catalítica. Outros mutantes em tabaco, tais como, Triptofano (W) 490 Fenilalanina (F), Cisteína (C) 411 Alanina (A) e Histidina (H) 477 Fenilalanina (F) também demonstraram os mesmos resultados.

2.6 Aspectos genéticos e moleculares da ALS

Em eucariotos o gene da ALS está situado no núcleo, apresentando herança mendeliana. Em condições de seleção pelo herbicida, alelos resistentes são dominantes sobre os sensíveis, sendo selecionados em condições heterozigóticas (Tranel, 2002). Até a presente data, os estudos realizados em plantas demonstraram a ausência de íntrons no gene da ALS (Duglebbby & Pang, 2000).

A atividade biossintética da ALS em eucariotos é encontrada tanto nas mitocôndrias (fungos e leveduras) como nos cloroplastos (algas e plantas

superiores), sendo necessária a presença de uma sequência de direcionamento da proteína para estas organelas. Esta sequência de trânsito corresponde, de maneira geral, a uma sequência entre 80 a 100 aminoácidos na região N-terminal. A sequência de trânsito é posteriormente clivada durante o processo de importação da proteína para a organela, originando o polipeptídeo maduro (Chipman, 1998).

Estudos realizados em plantas de tabaco demonstraram que os maiores níveis de expressão da ALS estão nos tecidos jovens, como brotos e folhas mais novas. Níveis intermediários podem ser observados nas regiões do caule e flores, enquanto pequenos níveis de expressão são observados em folhas senescentes. Neste mesmo estudo, foi observado que o nível total de transcritos referentes ao gene da ALS foi cerca de 0,1% de todo o RNA mensageiro da planta (Keeler et al., 1993).

A maioria das plantas possui uma única cópia do gene da ALS, no entanto, é possível encontrarmos exemplos de plantas com mais de uma cópia. Estas isoformas não necessariamente devem possuir diferentes propriedades enzimáticas ou fisiológicas, e, em muitos casos, derivam de diferentes progenitores, no caso de espécies aleloplóides (Chipman, 1998). Um exemplo é a presença de duas isoformas do gene da ALS em tabaco (Sur A e Sur B) derivados dos progenitores, por se tratar de uma espécie tetraplóide. Estas plantas apresentam a expressão entre os dois genes coordenada, mantendo a expressão média da proteína sempre constante (Keeler et al., 1993).

A enterobactéria *E. coli* possui três diferentes isoenzimas, cada uma composta de duas subunidades catalíticas, em torno de 60 KDa e duas subunidades reguladoras menores. Esta condição não é uma regra geral de procariotos, visto que, vários organismos que tiveram seu genoma completo seqüenciado, tais como *Haemophilus influenza* e *Bacillus subtilis*, apresentaram apenas um tipo de ALS (Chipman, 1998).

Do ponto de vista molecular, a primeira estrutura tridimensional da ALS foi determinada em leveduras (Pang et al., 2002a), até então eram utilizadas enzimas homólogas como modelos comparativos, por exemplo, a piruvato oxidase (POX), (Ott et al., 1996, Chipman et al., 1998) e a treonina desaminase (Lee, 2002).

Em leveduras, a ALS é formada por um dímero, onde cada monômero está dividido em três domínios de aproximadamente mesmo tamanho, sendo eles: α (resíduos 85 -269), β (resíduos 281-458) e γ (resíduos 474-643). As superfícies dos domínios α e γ formam a interface de cada monômero, enquanto que o domínio β , mais distante, tem a função de estabilização do dímero. Cada um destes domínios está posicionado em torno de seis dobras paralelas, que compõem uma estrutura do tipo β -sheet, rodeadas por α -hélices, como pode ser visto na Figura 2 (Pang et al., 2002a).

No ano de 2003, foi determinada por Pang e colaboradores a primeira estrutura cristalizada da ALS, proveniente de leveduras, em complexo com o herbicida chlorimuron ethyl, uma sulfoniluréia. Em 2004, Pang e seus

colaboradores, descreveram o primeiro estudo de uma proteína de plantas em complexo com um herbicida comercial, cristalizando a subunidade catalítica da ALS, de *Arabidopsis thaliana*, em complexo com o herbicida chlorimuron ethyl. Estes trabalhos abrem uma nova vertente para o entendimento do funcionamento desta classe de herbicidas e para a produção de novos compostos a serem utilizados no futuro.

Figura 2 - Estrutura tridimensional da ALS em leveduras. Fonte: Pang et al.,(2002a)

2.6.1 Bases moleculares da resistência

Salvo o mecanismo de resistência desenvolvido por biótipos de *Lolium rigidum*, que metabolizam rapidamente as moléculas do herbicida chlorsulfuron, todos os outros casos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS se dão por alterações no gene que codifica a enzima (Vargas, 1999).

Um método rápido que permite a diagnose de biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS foi descrito por Gerwick et al., (1993), Simpson et al., (1995) e Lovell et al., (1996). Este método baseia-se no acúmulo diferencial da acetoína, na presença e ausência de herbicidas inibidores da ALS e na formação de um complexo amarelo na presença de creatina e α -Naphthol, com pico de absorbância em 530nm. O acúmulo de acetoína é induzido pela inibição da enzima acetohidroxiácido isômero reductase (KARI), que atua após a ALS na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada. A inibição da ALS pelo herbicida impede o acúmulo de acetoína, formando a base para a diferenciação dos biótipos. Um inibidor químico da enzima KARI, o 1,1- ácido ciclopropanocarboxílico (CPCA) também deve ser usado na determinação. Assim sendo, em plantas sensíveis, a aplicação do herbicida + CPCA não permite o acúmulo de acetoína, devido à inibição da ALS pelo herbicida. Em plantas resistentes, a mistura do herbicida + CPCA permite o acúmulo de acetoína devido a não inibição da ALS pelo herbicida e pela inibição da KARI pelo CPCA.

Monqueiro et al., (2003) realizaram o ensaio para determinação de biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, descrito por Gerwick, (1993), em biótipos de *Bidens pilosa* e *Amaranthus quitensis*. Como resultado, foi determinado que os herbicidas chlorimuron ethyl e imazethapyr foram incapazes de inibir a ALS nos biótipos resistentes de ambas as espécies. Resultados semelhantes foram descritos por Ponchio, (1997), em relação aos biótipos resistentes de *Bidens pilosa*.

Vários estudos com base molecular também foram realizados descrevendo substituições de aminoácidos, identificados em biótipos de plantas daninhas, que conferem resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

As substituições de aminoácidos, descritas conferindo resistência aos herbicidas inibidores da ALS, estão distribuídas em cinco domínios conservados ao longo da região codificadora do gene da ALS. Estes domínios apresentam tamanho entre 12 e 57pb, sendo eles: domínio A (AITGQVPRRRMIGT), domínio B (QWED), domínio C (VFAYPGGASMEIHQALTRS), domínio D (AFQETP) e domínio E (IPSGG), estando sublinhado o resíduo variável (Boutsalis et al., 1999).

Tranel et al., (2004) listaram a relação dos principais motivos e suas possíveis substituições em diversas espécies, como pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Principais substituições de aminoácidos, que conferem resistência aos herbicidas inibidores da ALS, encontradas em espécies daninhas

Aminoácido resíduo	Subst. Conf. Resist.	Espécie daninha	SU	IMI	PTB	TP	SCT	Ano
Ala 122 (Dom. C)	Thr	<i>Xanthium strumarium</i>	S	R	S	ND	ND	1995
	Thr	<i>Amaranthus hybridus</i>	S	R	ND	ND	ND	1998
	Thr	<i>Solanum ptycanthum</i>	S	R	ND	ND	ND	2000
Pro 197 (Dom. A)	His	<i>Lactuca serriola</i>	R	r	S	r	ND	1992
	Thr	<i>Kochia scoparia</i>	R	S	ND	R	ND	1992
	Arg	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Leu	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Gln	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Ser	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Ala	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Ala	<i>Brassica tournefortii</i>	R	S	ND	R	ND	1999
	Ile	<i>Sisymbrium orientale</i>	R	r	ND	R	ND	1999
	Leu	<i>Amaranthus retroflexus</i>	R	R	R	R	ND	2001
	Ala	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	S	ND	R	ND	2002
	Thr	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	S	ND	R	ND	2002
	Ala	<i>Lindernia dúbia</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia dubia</i> var. major	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Gln	<i>Lindernia micrantha</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia micrantha</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Gln	<i>Lindernia procumbens</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia procumbens</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Amaranthus blitoides</i>	R	S	R	r	ND	2003
	His	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	S	ND	R	ND	2003
	Ser	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	S	ND	R	ND	2003
	His	<i>Papaver rhoeas</i>	R	S	ND	r	ND	2004
	Thr	<i>Papaver rhoeas</i>	R	S	ND	r	ND	2004
	Ser	<i>Papaver rhoeas</i>	R	S	ND	r	ND	2004
	Ser	<i>Bromus tectorum</i>	R	S	ND	ND	R	2004
Ala 205 (Dom. D)	Val	<i>Xanthium strumarium</i>	r	r	R	r	ND	1996
	Val	<i>Helianthus annuus</i>	r	R	ND	ND	ND	2003
Trp 574 (Dom. B)	Leu	<i>Xanthium strumarium</i>	R	R	R	R	ND	1995
	Leu	<i>Amaranthus rudis</i>	R	R	ND	R	ND	1996
	Leu	<i>Amaranthus hybridus</i>	R	R	ND	R	ND	1997
	Leu	<i>Kochia scoparia</i>	R	R	ND	ND	ND	1999
	Leu	<i>Sisymbrium orientale</i>	R	R	ND	R	ND	1999
	Leu	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	R	R	ND	R	ND	2001
	Leu	<i>Ambrosia trifida</i>	R	R	ND	R	ND	2002
	Leu	<i>Raphanus raphanistrum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2002
	Leu	<i>Amaranthus blitoides</i>	R	R	R	R	ND	2003
	Thr	<i>Amaranthus powellii</i>	S	R	ND	ND	ND	2001
Ser 653 (Dom. E)	Thr	<i>Amaranthus retroflexus</i>	S	R	ND	ND	ND	2001
	Asn	<i>Amaranthus rudis</i>	S	R	ND	S	ND	2001
	Thr	<i>Amaranthus rudis</i>	S	R	ND	S	ND	2001

Fonte: Tranel, et al., (2004). Onde SU (sulfoniluréias), IMI (imidazolinonas), PTB (pirimidil-tiobenzoatos), TP (triazolopirimidinas), SCT (sulfonilamino-carbonil-triazolinonas), S (sensível), r (resistente <10x), R (resistente >10x), ND (não determinado).

Embora já utilizados a mais de dez anos, apenas agora estão surgindo evidências sobre os mecanismos, pelos quais, os herbicidas inibidores da ALS atuam. Até então era conhecido apenas que os herbicidas funcionavam como inibidores externos, não ocupando o sítio ativo da enzima (Schloss, 1988). Hoje é conhecido que as moléculas de seus princípios ativos não se assemelham nem com os substratos ou produtos, nem tampouco, com os cofatores requeridos na reação catalisada pela ALS (Duggleby et al., 2003). Pang et al., (2003) em estudos com a proteína ALS, proveniente de leveduras, em complexo com o herbicida chlorimuron ethyl (sulfoniluréia), determinaram que o grupo sulfonil e o anel aromático da molécula de herbicida estavam situados na entrada do canal de acesso dos substratos. A presença da molécula do herbicida nesta posição bloquearia completamente o acesso para o sítio ativo, inibindo a ALS por este mecanismo (Figura 3).

Figura 3 – (a) Canal de acesso aos substratos, mostrando a ThDP. (b) Canal de acesso aos substratos bloqueado pelo chlorimuron ethyl. As superfícies estão coloridas em azul (domínio α), amarelo (domínio β) e verde ("loop móvel" domínio γ). Fonte: Pang et al., (2003)

Dentre todas as alterações de aminoácidos observadas conferindo resistência aos herbicidas inibidores da ALS, a alteração do aminoácido Triptofano (W) 574 pelo aminoácido Leucina (L) é descrita na literatura como sendo a que confere o maior nível de resistência, e, na maioria dos casos, resistência múltipla às sulfoniluréias e imidazolinonas. Hanson et al. (2004) descreveram que biótipos sensíveis de *Camelina microcarpa* foram 1000 e 10000 vezes mais susceptíveis aos herbicidas metsulfuron e chlorsulfuron respectivamente, quando comparados a biótipos resistentes da mesma espécie, os quais haviam sofrido a alteração do aminoácido Triptofano (W) pelo aminoácido Leucina (L). Os biótipos foram resistentes também a outras sulfoniluréias, sulfonilamino-carbonil-triazolinonas, imidazolinonas e triazolopirimidinas. Em contrapartida, biótipos de *Sisymbrium orientale* e *Brassica tournefortii*, que sofreram alterações do aminoácido Prolina (P), na região do domínio A, pelo aminoácido Isoleucina (I) e Alanina (A) respectivamente, demonstraram resistência inferior a 100 vezes às sulfoniluréias e inferiores a 12x às imidazolinonas e triazolopirimidinas (Boutsalis et al., 1999).

Estudos realizados com leveduras sugerem que as alterações dos aminoácidos Prolina (P) pelo aminoácido Serina (S), na posição 192 e do aminoácido Triptofano (W) pelo aminoácido Leucina (L), na posição 586, interagem com características moleculares comuns a todas as sulfoniluréias. O aminoácido Prolina seria responsável pela interação com o anel S das moléculas do herbicida. Quanto ao aminoácido Triptofano, este estaria ligado

ao anel N, referente à pirimidina nas sulfoniluréias, e sua substituição pela leucina, eliminaria uma estrutura π -orbital (Duggleby et al., 2003).

Pang et al., (2003) sugeriram que os aminoácidos Metionina (M-582) e Triptofano (W-586), em leveduras, estão presentes em uma região da proteína denominada “loop móvel”, diretamente em contato com o herbicida, e que, conformações alternativas da seqüência de aminoácidos não permitiriam a ligação do herbicida. Neste estudo foi demonstrado que a alteração do aminoácido Triptofano (W-586) pelo aminoácido Leucina (L), resultou em redução da sensibilidade ao herbicida chlorimuron ethyl de 6250 vezes. A estrutura cristalizada da ALS, em complexo com o herbicida, mostrou que o aminoácido Triptofano está envolvido com interações de ligação entre a ALS e o anel pirimidil da molécula de chlorimuron ethyl. A alteração para o aminoácido Leucina (um aminoácido menor e não aromático) causaria a quebra destas interações, condizendo com a grande redução da sensibilidade ao herbicida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Sementes de *Bidens pilosa* e *Amaranthus quitensis* foram coletadas de áreas produtoras de soja dos municípios de Castro (PR, Brasil) e Córdoba (Argentina), respectivamente. As sementes foram cedidas pelo Prof. Pedro Jacob Christoffoleti, do Departamento de Produção Vegetal – ESALQ/USP. Essas áreas têm sido pulverizadas por pelo menos 8 anos com herbicidas inibidores da enzima ALS e nos últimos anos agrícolas foram observados escapes de *B. pilosa* e *A. quitensis*, que até então vinham sendo controlados.

Plantas de *B. pilosa* e *A. quitensis*, provenientes de áreas problemáticas foram denominadas de biótipo R (resistente). Outras amostras de sementes destas espécies foram coletadas de áreas que nunca receberam pulverizações com os herbicidas inibidores da ALS, sendo portanto, essa população denominada de biótipos S (sensível).

3.2 Determinação da curva dose-resposta

3.2.1 Tratamentos com o herbicida

O tratamento com herbicidas foi realizado em casa-de-vegetação, com plantio de sementes provenientes de biótipos resistentes e sensíveis, em vasos contendo mistura de substrato comercial e solo, na proporção 3:1. Após a emergência das sementes realizou-se o desbaste, mantendo-se apenas 5 plantas por vaso. A aplicação do herbicida ocorreu no momento em que as plantas apresentaram o segundo par foliar verdadeiro (6 a 8cm de altura).

O herbicida foi aplicado sobre a parte aérea das plantas em câmara de pulverização, no Laboratório de Herbicidas do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP. O produto comercial Classic (chlorimuron ethyl - sulfoniluréia), da DuPont, foi aplicado em mistura com água e surfactante (3%) na vazão de 300L/ha e pressão de 40lb/pol², com dose recomendada para o controle deste tipo de daninhas de 80g.i.a./ha. Foram estabelecidos os seguintes tratamentos:

Tabela 4. Tratamentos utilizados no teste com o herbicida Classic

Tratamentos	Dose (g.i.a./ha)
1	0,0
2	8,0
3	80,0
4	800,0
5	8000,0

As doses foram determinadas com a finalidade de determinar a dose GR₅₀ (dose de herbicida necessária para inibir 50% do crescimento das plantas daninhas).

Foram realizadas 4 repetições para cada tratamento e as avaliações foram feitas aos 14, 21 e 28 dias após aplicação.

As avaliações foram feitas estipulando-se notas, que representaram os danos causados pelos tratamentos com herbicida, comparando-se com o tratamento testemunha, sem herbicida. As notas variaram de 0 a 100, onde 0 representava nenhum controle e 100 representava o controle total das plantas. A nota resultante em cada tratamento foi determinada avaliando-se a média das 5 plantas por vaso.

Biótipos resistentes e sensíveis ao herbicida foram classificados pelo tratamento com o herbicida e analisados estatisticamente, amostras destes biótipos seguiram para estudos moleculares.

3.2.2 Análise estatística dos dados

Para a análise da significância dos tratamentos foi realizado o teste estatístico de Tukey. O teste foi realizado para cada biótipo de cada espécie separadamente

Posteriormente foi realizada a análise de regressão não linear para cada biótipo, seguindo o modelo Log-logístico proposto por Seefeldt et al., (1995). Este modelo representa uma curva do tipo sigmóide, relacionando a resposta da planta (y), em função da dose (x).

O modelo é representado pela seguinte equação:

$$y = f(x) = C + \frac{D - C}{1 + (x/I_{50})^b}$$

$$= C + \frac{D - C}{1 + \exp[b(\log(x) - \log(I_{50}))]}$$

Onde: C= limite superior da curva, D= limite inferior, b= declividade e I_{50} = dose que corresponde a 50% de resposta.

As análises do Teste de Tukey, e as análises estatísticas com base no modelo Log-logístico (Seefeldt, 1995), foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc.).

3.3 Clonagem de segmentos do gene que codifica a enzima ALS

3.3.1 Isolamento de DNA total para clonagem do gene da ALS

A extração de DNA, foi baseada na metodologia de Doyle & Doyle, (1987), utilizando-se cerca de 250mg de folhas novas dos biótipos resistentes e suscetíveis de *B. pilosa* e *A. quitensis* maceradas na presença de nitrogênio líquido. Foram realizadas duas lavagens com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e tratamento com RNase (10mg/mL). Depois de precipitado com etanol e centrifugado, o DNA foi ressuspendido em um volume de 25 μ L de água Mili-Q. Foi extraído o DNA de 10 plantas de *B. pilosa*, sendo 5 do biótipo resistente e 5 do biótipo sensível e 10 plantas de *A. quitensis* sendo 5 do biótipo resistente e 5 do biótipo sensível.

3.3.2 Amplificação da região interna do gene que codifica a enzima ALS

A amplificação do gene que codifica a enzima ALS foi iniciada a partir da amplificação de fragmentos internos por PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase). Os oligonucleotídeos, ou *primers*, foram sintetizados baseados em seqüências conservadas entre o gene em *Xanthium* sp. e milho (*Zea mays*) estudadas por Bernasconi et al., (1995).

Foram sintetizados seis *primers*:

HC 77 5'GT(A/C/G/T)TT(C/T)GC(G/T)TA(C/T)CC(A/T)GG(A/C/T)GG(A/C/T)G 3'

HC 78 5' CC(A/T)CG(A/C/T)CA(A/T)GA(A/G)CA(A/G)GG(C/G/T)G 3'

HC 79 5' GG(A/G/T)ATGCA(C/T)GG(G/T)AC(C/G/T)GT(G/T)TA(C/T)G 3'

HC 80 5' C(A/G)TA(A/C)AC(A/C/G)GT(A/C)CC(A/G)TGCAT(A/C/T)CC 3'

HC 81 5'CCATC(A/C/G/T)CC(A/G)TC(A/G)AT(A/G)(A/G)C(A/C/T)AC(A/C/T)AC3'

HC 82 5' CAT(A/C/G)GGCA(A/G)(A/C)AC(A/G)TG(C/T)TC 3'

HC 88 5'CGAATCACCGGACAA 3'

HC 89 5'GCTGAATATCTTTCGG 3'

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 100ng de DNA total, 5 μ L de solução tampão 10x , 1.5 μ L de MgCl₂ (50mM), 2 μ L de solução de dNTPs (1,25mM), 2 μ L dos *primers* (10pmoles/ μ L), 0.5 μ L de Taq DNA Polymerase (5U/ μ L –Invitrogen CAT. 18038-018) sendo o volume de 50 μ L complementado com água Mili-Q.

Foi utilizado no termociclador (Modelo PTC-100TM – MJ Research, INC) o programa ALS, com a seguinte programação: 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por

1 minuto (pareamento) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (alongamento); e temperatura final de 4°C.

Tabela 5. Combinações de *primers* utilizados e respectivos fragmentos esperados

Combinações	Fragmentos esperados
HC77 – HC 89	465pb
HC 77 - HC 80	384pb
HC 77 – HC 81	1287pb
HC 77 – HC 82	1650pb
HC 78 - HC 80	645pb
HC 78 – HC 81	780pb
HC 79 – HC 81	579pb
HC 79 – HC 82	900pb
HC 81 – HC 88	1059pb

3.3.3 Eletroforese e purificação dos fragmentos

A eletroforese dos fragmentos amplificados via PCR (50µl) foi realizada em gel de agarose 0,8% a 4V/cm. Cada banda de tamanho esperado para a combinação dos *primers* utilizados foi isolada e purificada através do Kit GFX - PCR and Gel Band Purification (Amersham Biosciences – CAT. 27-9602-01) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.3.4 Ligação dos fragmentos no vetor pUC 18

Os fragmentos foram clonados no vetor pUC18, utilizando-se o SureClone™ Ligation KIT (Amersham Pharmacia – não mais disponível no mercado), através do reparo das extremidades com a enzima Klenow e T4 polimerase, purificação e ligação, como recomendado pelo fabricante.

3.3.5 Preparo de células de *E. coli* competentes à transformação

Amostras da bactéria, linhagem DH5a, estocadas a -80°C, foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido (Miller, 1972), sem antibióticos, e incubadas a 37°C durante 16 horas.

Para preparo da pré-cultura, colônias isoladas da bactéria foram inoculadas em 10mL de meio SOC líquido (Hanahan, 1983), sem antibiótico e incubados a 37°C, sob agitação de 220rpm até que atingisse a absorbância de 0,6D.O. a 600nm.

Foram transferidos 2mL da pré-cultura para 200mL de meio SOC líquido (Hanahan, 1983) e incubados novamente a 37°C, sob agitação de 220rpm até que a cultura atingisse a absorbância de 0,6D.O. a 600nm.

A cultura foi transferida para um tubo de centrífuga de 200mL e incubada durante 10 minutos no gelo. Posteriormente a cultura de bactérias foi centrifugada a 4°C, em uma ultracentrífuga Sorvall, utilizando rotor GSA, a

5000xg durante 10 minutos. O meio de cultura foi descartado e a massa de bactérias ressuspensa em 30mL da solução tampão RF1 (30mM KAc, 100mM RbCl, 10mM MnCl, 10mM CaCl e 15% de glicerol P/V) pH 5,8.

A cultura de bactérias foi novamente centrifugada a 5000xg e 4°C, durante 10 minutos, a solução tampão foi descartada e a massa de bactérias ressuspensa em 16mL da solução tampão RF2 (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl e 15% glicerol P/V) pH6,8. Alíquotas de 200 μ L foram distribuídas em tubos estéreis de 1,5mL, congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.3.6 Transformação de células de *E. coli*, linhagem DH5 α por choque térmico

Foi utilizado para a transformação 200 μ L de células competentes e 10 μ L da reação de ligação incubando-se em gelo durante 20 minutos. Posteriormente os tubos foram transferidos para bloco térmico a 42°C durante 2 minutos e novamente incubados em gelo durante 3 minutos. Decorrido o tempo foi adicionado 1mL de meio SOC (Hanahan, 1983) sem antibióticos aos tubos e incubados a 37°C durante 1 hora sob agitação de 220rpm. Foram inoculados 100 μ L da transformação em placas de Petri contendo meio LB sólido (Miller, 1972), adicionado de 100mg/L de ampicilina, e 1mL/L de solução de IPTG + X-

GAL (0,2g X-GAL + 0,048g IPTG em 10mL de dimetil formamida). As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

3.3.7 Seleção dos transformantes e extração do DNA plasmidial das bactérias

As colônias transformadas foram selecionadas a partir da diferenciação de sua cor na presença do IPTG + X-GAL. Colônias com a capacidade de expressar a β -galactosidase utilizam o X-GAL como substrato, produzindo colônias de coloração azul, sendo consideradas não transformadas. Colônias que não expressam a β -galactosidase, devido à introdução do inserto interrompendo a região codificadora desta proteína, não são capazes de utilizarem o X-GAL como substrato, deixando assim suas colônias brancas e consideradas transformadas.

O método de extração do DNA plasmidial utilizado foi o de lise alcalina, descrito por Sambrook et al., (2001).

3.3.8 Reação de seqüenciamento

Todos os clones produzidos na clonagem dos fragmentos do gene da ALS foram seqüenciados utilizando o seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) de 16 capilares, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) da ESALQ/USP.

Na reação de amplificação dos fragmentos para o seqüenciamento foram utilizadas entre 200 a 500ng de DNA plasmidial, 2 μ L de tampão de seqüenciamento, 2 μ L de Big Dye TerminatorTM V3 (Perkin Elmer Byosystems – Cat. 4390244), 2 μ L de *primer* (10pmoles/ μ L), sendo o volume final completado para 10 μ L com água Mili-Q. As reações foram feitas em microplacas de 96 cavidades. Foi utilizado para amplificação no termociclador o programa Sequen, com a seguinte programação: Incubar: 96°C 2minutos, 35 ciclos de: 96°C por 45 segundos (desnaturação), 50°C por 30 segundos (pareamento), 60°C por 4 minutos (extensão), 60°C por 2 minutos (extensão final) e temperatura final de 4°C.

Para a purificação das amostras amplificadas, foram adicionados 60 μ L de isopropanol 75%, agitando vigorosamente, e incubando a placa durante 20 minutos, no escuro, a temperatura ambiente. As placas foram centrifugadas a 4°C, durante 45 minutos a 1700xg. O isopropanol foi descartado e foram adicionados 150 μ L de etanol 70%. Repetiu-se a centrifugação, como descrito acima. Posteriormente o etanol foi descartado e a placa foi incubada a 94°C durante 2 minutos, para total evaporação do etanol. No momento do seqüenciamento foi adicionado 10 μ L de formamida às amostras e a microplaca foi aquecida a 95°C durante 3 minutos para a desnaturação do DNA.

3.3.9 Bioinformática

A análise da qualidade das seqüências, montagem dos contigs e alinhamento dos fragmentos, foi realizada com o auxílio do programa computacional VECTOR NTI[®] Suíte V.6.0 (InforMax).

As análises de similaridade junto ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2004), foram realizadas utilizando a ferramenta BLAST (BLAST, 2004).

O alinhamento das seqüências correspondentes à região codificadora do gene da ALS completa, foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W, (CLUSTAL W, 2004; Higgins et al., 1994).

3.4 Obtenção das extremidades 5' e 3' do gene da ALS

Conhecendo-se a seqüência dos fragmentos internos do gene da ALS, foi possível a utilização da estratégia de amplificação das extremidades do gene a partir do cDNA. Para tanto foi utilizado o SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit da empresa Clontech (CAT – K1811-1). Antes da utilização do Kit foi necessária a extração de RNA total das plantas e preparo do cDNA.

3.4.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen – Cat. 15596-018). Cerca de 50 a 100mg de folhas novas das plantas foram colocadas em tubos de centrifuga de 1,5mL e maceradas na presença de nitrogênio líquido. Foi adicionado ao material macerado 1mL de TRIzol®, e incubou-se durante 5 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 4°C, durante 10 minutos a 12000xg. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 200µL de clorofórmio e homogeneizando-se vigorosamente. Uma nova centrifugação foi realizada a 4°C, durante 15 minutos a 12000xg. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo onde o RNA foi precipitado pela adição de 500µL de isopropanol e incubação durante 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 4°C, por 20 minutos a 12000xg. O RNA foi lavado com 1mL etanol 75% e centrifugado durante 1 minuto a 12000xg. O etanol foi retirado com o auxílio de uma micropipeta, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 30µL de água tratada com DEPC. A integridade do RNA foi observada por eletroforese em gel de agarose 1%, a 4 V/cm.

3.4.2 Amplificação das extremidades 5' e 3' do gene da ALS

O princípio do método baseia-se na amplificação das extremidades 5' e 3' do gene a partir do cDNA (transcrito do mRNA) utilizando adaptadores especiais nas regiões 5' CAP e cauda poli A e *primers* gene específicos.

Para a amplificação das extremidades 5' e 3' do gene da ALS, inicialmente, foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA a partir do RNA. Posteriormente foi realizada a amplificação dos fragmentos referentes às extremidades do gene, com a utilização de *primers* adaptadores e *primers* gene específicos. Todos os protocolos utilizados foram os do manual que acompanha o SMART™ RACE cDNA Amplification Kit da empresa Clontech (CAT – K1811-1).

Os *primers* gene específicos utilizados foram:

B. pilosa – 5' RACE:

HC 42 - 5' CCC TCA AAG AAC TTT GCG CAG C 3'

B. pilosa – 3' RACE:

HC 87 - 5' CGA GTA GTT GCT CGG CCA GAT GCG GTA G 3'

A. quitensis – 5' RACE:

HC 39 – 5' GAC TCA GTT CTT CAC GTA GTC G 3'

A. quitensis – 3' RACE:

HC 38 - 5' CGA GTT GGC TAC GAT TAG GGT AGA G 3'

3.5 Clonagem e seqüenciamento do gene completo da ALS

A obtenção da seqüência completa da região codificadora do gene da ALS em *B. pilosa*, foi possível a partir da reação de PCR utilizando *primers* desenhados com base nas seqüências obtidas no experimento de amplificação das extremidades 5' e 3', denominado RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Já para a amplificação do gene da ALS em *A. quitensis*, o *primer* 3' foi desenhado com base na seqüência obtida da amplificação da extremidade 3' (RACE) enquanto a seqüência do *primer* 5' foi obtida a partir da análise de similaridade com outras espécies do gênero *Amaranthus*, depositadas previamente no banco de dados do NCBI (NCBI, 2004). Foram introduzidos sítios de restrição para a enzima *Bgl* II e *Spe* I nos *primers*.

Os *primers* sintetizados foram:

HC 201 - Amplificação da extremidade 5' do gene da ALS em *B. pilosa*.

5' CCCAGATCTATGGCGGCTCTCACTCCTTCA 3'
 Bgl II

HC 202 - Amplificação da extremidade 5' do gene da ALS em *B. pilosa*.

5' CCCACTAGTGTACTTCGTTCTGGCGTCACC 3'
 Spe I

HC 199 – Amplificação da extremidade 5' do gene da ALS em *A. quitensis*.

5' - CCCAGATCTATGGCGTCCACTTCTTCAAAC - 3'
 Bgl II

HC 200 - Amplificação da extremidade 3' do gene da ALS em *A. quitensis*.

5' - CCCACTAGTATAAGCCCTTCTTCCATCACC - 3'
 Spe I

As reações de amplificação foram preparadas conforme o item 3.3.2 e o programa usado foi o ALS 2, que segue a seguinte programação: Incubar: 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto (desnaturação); 58°C por 1,0 minuto (pareamento); 72°C por 2 minutos (extensão) e temperatura final de 4°C.

Os fragmentos obtidos foram identificados por eletroforese e aqueles com tamanho esperado foram purificados como descrito no item 3.3.3.

Os fragmentos amplificados e purificados provenientes de 10 plantas de *A. quitensis* (5 biótipos resistentes e 5 biótipos sensíveis) e 10 plantas de *B. pilosa* (5 biótipos resistentes e 5 biótipos sensíveis) foram clonados no vetor pGEM-T (Promega – CAT - A1360).

A reação de ligação foi realizada adicionando-se 5 μ L do produto de PCR (30ng/ μ L) a 1 μ L do vetor pGEM-T (50 ng/ μ L), 3 μ L de 2x Ligation Buffer e 1 μ L da enzima T4 DNA ligase (3U/ μ L), o volume foi completado para 15 μ L com água Mili-Q estéril. A reação foi incubada a 4°C, durante 16 horas.

A transformação de bactérias, seleção dos transformantes, isolamento dos plasmídeos e seqüenciamento foram realizadas como descrito nos itens 3.3.6, 3.3.7 e 3.3.8, respectivamente.

Os produtos do seqüenciamento de nucleotídeos foram analisados quanto à qualidade e similaridade com o banco de dados (NCBI, 2004) e alinhados conforme descrito no item 3.3.9.

3.6 Clonagem do gene da ALS no vetor binário pCAMBIA 1302

O vetor binário pCAMBIA 1302 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Para a clonagem da região codificadora do gene da ALS no vetor binário pCAMBIA 1302, foram utilizadas as construções obtidas anteriormente, contendo o gene da ALS amplificados de biótipos resistentes e sensíveis das plantas de *B. pilosa* e *A. quitensis*, no vetor pGEM T Easy.

Estes clones foram digeridos com as enzimas de restrição *Spe* I e *Bgl* II para a liberação do inserto. A reação conteve 100ng dos plasmídeos, 0,5 μ L de *Spe* I (10U/ μ L - Invitrogen CAT- 15443-013), 0,5 μ L de *Bgl* II (10U/ μ L - Invitrogen CAT- 15213-010), 4 μ L de Tampão Cuts ALL (100mM TRIS HCl pH 7,5, 35mM MgCl₂, 500mM de KCl, 10mM de β -Mercaptoetanol, 500 μ g/mL de BSA) e água Mili-Q suficiente para completar o volume final de 20 μ L e incubada a 37°C durante 2 horas. O vetor pCAMBIA 1302 também foi digerido nas mesmas condições, possibilitando a ligação do inserto entre o gene promotor CaMV 35S e a proteína fluorescente GFP6 (Green Fluorescent Protein). Para a fusão entre a proteína ALS e a GFP foi retirado o códon de terminação do gene da ALS (UAG em *A. quitensis* e UGA em *B. pilosa*), deixando apenas a sequência terminadora da GFP. Após a eletroforese e purificação do inserto e do vetor digeridos foi realizada a reação de ligação utilizando-se 0,5 μ L do vetor pCAMBIA 1302 (100ng/ μ L), 4,0 μ L dos insertos (50ng/ μ L), 1 μ L de T4 DNA

Ligase (1U/ μ L – Invitrogen –CAT. 15224-017), 1 μ L de 10x Ligase Buffer, 3,5 μ L de água Mili-Q, incubando a reação a 4°C, durante 16 horas.

Após a ligação, a região de transferência ou T-DNA ficou desenhada contendo: o gene *hpt II* de resistência à higromicina e seu promotor CaMV 35S, o gene *lacZ* alpha, novamente o promotor CaMV 35S (responsável pela regulação da ALS), a região codificadora do gene da ALS (sem o terminador), o gene mGFP 6, a região Histidina Tag e a região poli A do gene Nos (Nopalina Sintase), entre as bordas esquerda e direita do T-DNA. Completando o vetor, fora da região de transferência encontram-se o gene *aadA*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e as regiões de origem de replicação (ori) pBR322 e pVS1.

3.7 Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens*

3.7.1 Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* competente para transformação

Para o preparo de células de *Agrobacterium tumefaciens* competentes para transformação, foi inoculada uma colônia isolada da bactéria em 3 mL de meio YEB líquido (Vervliet et al., 1975) contendo 50 μ g/mL de rifampicina e incubada a 28 °C, com agitação de 110rpm, durante 16 horas. Posteriormente 2mL deste pré-inóculo foi transferido para 50mL de meio YEB (Vervliet et al.,

1975) sem antibiótico e incubado a 28 °C e agitação de 110rpm, durante 16 horas.

Após atingir a fase exponencial de crescimento (absorbância 0,6 a 600nm) a cultura de bactérias foi incubada 10 minutos no gelo e centrifugada a 5000xg, a 4°C durante 5 minutos. Depois de centrifugado, o meio de cultura foi descartado e a massa de bactérias foi ressuspensa em 1mL de CaCl₂ 20mM, previamente gelado a 4°C (usar 1mL a cada 50mL de cultura de bactéria). Aliquotas de 100µL foram distribuídas em tubo de 1,5mL resfriados no gelo e congelados em N₂ líquido e armazenados em freezer a -80°C. Todo o procedimento foi realizado em gelo.

3.7.2 Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico

Para a transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens*, 1µg de DNA foi adicionado à solução de células competentes, descrita anteriormente, e incubada durante 30 minutos no gelo, posteriormente, as amostras foram congeladas em N₂ líquido por 5 minutos e transferidas para bloco térmico a 37°C, durante 5 minutos. Terminado o choque térmico, foi adicionado 1mL de meio YEB (Vervliet et al., 1975) às amostras e incubou-se a 28°C durante 4 horas. Para a seleção das células transformadas, plaqueou-se 100µL da solução de células em placas de Petri contendo meio LB (Miller, 1972)

adicionado de 50µg/mL de rifampicina e 100µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas durante 2 a 3 dias a 28°C.

A análise das bactérias transformadas foi realizada a partir da extração do plasmídeo pelo método de lise alcalina (Sambrook, 2001) das colônias obtidas e digestão do plasmídeo com as enzimas *Bgl* II e *Spe* I, como descrito no item 3.6.

3.8 Transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Colônias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens*, linhagem LBA 4404, contendo as construções de interesse, foram incubadas em meio YEB (Vervliet et al., 1975) líquido, contendo 50µg/mL do antibiótico rifampicina e 100µg/mL do antibiótico canamicina, a 28°C, sob agitação de 110rpm, durante 16 horas, ou até atingirem densidade ótica a 600nm entre 0,5 e 1D.O.. Foi transferido para tubo de centrifuga estéril 1mL da solução de bactérias e centrifugado a 5000xg durante 5 minutos. O meio de cultura foi descartado e as bactérias foram ressuspensas em 1mL de solução de NaCl (0,85%) e mantidas a temperatura ambiente (Brasileiro, 1998).

Folhas de tabaco, provenientes de cultura de tecidos, foram cortadas em discos de 1cm de diâmetro, com o auxílio de um vazador, sobre papel de filtro Whatman #1 e transferidos para placa de Petri contendo água esterilizada. Posteriormente a água foi substituída pela suspensão de bactérias na solução de NaCl (0,85%), mantendo os discos de folhas de tabaco incubados durante 1

minuto. Com cuidado, retirou-se o excesso da suspensão de bactérias com um pedaço de papel de filtro estéril e transferiu-se os discos foliares de tabaco para placas de Petri contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), sem fitorreguladores e antibióticos, com a ajuda de uma pinça esterilizada. As placas foram mantidas na sala de crescimento, a 25°C, durante dois dias. Após este período, os discos foram transferidos para meio MS (Murashige & Skoog, 1962) indutor de brotação contendo 1mL de BAP (0,1g/L), 1mL de NAA (0,1g/L), 500µg/mL de cefotaxima e 50µg/mL de higromicina e incubados a 25°C em sala de crescimento iluminada, durante 3 a 5 semanas. Os brotos obtidos foram transferidos para meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 250µg/mL de cefotaxima e 50µg/mL de higromicina para alongamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tratamento com o herbicida

A partir dos resultados do teste de Tukey podemos verificar a significância dos tratamentos com o herbicida, aplicados no experimento. Para os biótipos resistentes, em ambas as espécies, foi determinado com a ajuda do teste, que todos os tratamentos foram significativos ao nível de 1% de probabilidade de erro. Em relação aos biótipos sensíveis, também em ambas as espécies, foi determinado que os tratamentos T3 (80,0g.ia/ha), T4 (800,0g.ia/ha) e T5 (8000,0g.ia/ha), não diferiram significativamente entre si, ao nível de 1% de probabilidade de erro. Os resultados do teste estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do teste de Tukey aplicado para a avaliação da significância dos tratamentos. Letras iguais ao lado dos tratamentos demonstram que estes não foram significativos ao nível de 1% de probabilidade de erro. Tratamentos acompanhados de letras diferentes foram considerados significativos ao nível de 1% de probabilidade. Os tratamentos estão representados como: T1 (testemunha), T2 (8,0g.i.a./ha), T3 (80,0g.i.a./ha), T4 (800,0g.i.a./ha) e T5 (8000,0g.i.a./ha). Onde R (biótipos resistentes), S (biótipos sensíveis) e G.L. (grau de liberdade)

<i>A. quitensis</i> (R)			<i>A. quitensis</i> (S)		
Tratamentos	Média controle (%)	Parâmetros	Tratamentos	Média controle (%)	Parâmetros
T1 ^A	0	$R^2 = 0,983$ $F = 227,65$ G.L.=15	T1 ^A	0	$R^2 = 0,994$ $F = 654,35$ GL=15
T2 ^B	6,26		T2 ^B	38,75	
T3 ^C	16,25		T3 ^C	93,75	
T4 ^D	31,25		T4 ^C	100	
T5 ^E	42,50		T5 ^C	100	
<i>B. pilosa</i> (R)			<i>B. pilosa</i> (S)		
Tratamentos	Média controle (%)	Parâmetros	Tratamentos	Média controle (%)	Parâmetros
T1 ^A	0	$R^2 = 0.983$ $F = 223.11$ G.L.=15	T1 ^A	0	$R^2 = 0.999$ $F = 4575$ GL=15
T2 ^B	25		T2 ^B	87,5	
T3 ^C	41.25		T3 ^C	100	
T4 ^D	62.50		T4 ^C	100	
T5 ^E	88.750		T5 ^C	100	

A partir da avaliação visual dos tratamentos das plantas com o herbicida Chlorimuron ethyl e análises estatísticas, foi observado que a dose recomendada para controle das plantas daninhas *B. pilosa* e *A. quitensis*, de 80g.i.a./ha, não foi satisfatória (Figura 4).

(a)

(b)

Figura 4 - Demonstração do crescimento de plantas de *A. quitensis* (a) e *B. pilosa* (b), 21 dias após a aplicação do herbicida chlorimuron ethyl. Os tratamentos são representados como: T1 (testemunha), T2 (8,0g.i.a./ha), T3 (80,0g.i.a./ha), T4 (800,0g.i.a./ha) e T5 (8000,0g.i.a./ha). Onde R (biótipos resistentes) e S (biótipos sensíveis)

Através dos resultados da última avaliação da porcentagem de controle de cada tratamento, foram construídos gráficos para a determinação da GR₅₀ (Figura 5 e 6).

Figura 5 - Porcentagem de controle dos biótipos resistentes e sensíveis de *A. quitensis*, 28 dias após a aplicação do herbicida Chlorimuron ethyl

Figura 6 - Porcentagem de controle dos biótipos resistentes e sensíveis de *B. pilosa*, 28 dias após a aplicação do herbicida Chlorimuron ethyl

A visualização dos gráficos mostra que a dose recomendada controlou em quase sua totalidade os biótipos sensíveis de *A. quitensis* (90 a 100% de controle) e em sua totalidade os biótipos sensíveis de *B. pilosa* (100% de controle). Eventuais escapes podem ser atribuídos por problemas durante a aplicação do herbicida, visto que, a dose recomendada (80g.i.a./ha) deveria controlar totalmente os biótipos sensíveis de ambas as espécies. Os biótipos resistentes de *A. quitensis* não foram controlados satisfatoriamente nem com o tratamento mais severo (T5 – 8000g. i.a./ha), apresentando menos de 50% de controle. Os biótipos resistentes de *B. pilosa*, por sua vez, foram controlados em quase sua totalidade pelo tratamento mais severo (80 a 100% de controle). As tabelas com as notas atribuídas em todas as avaliações estão apresentadas no anexo A.

4.1.1 Análises estatísticas

Como resultado da análise de regressão não linear para cada biótipo, foram obtidos os parâmetros da equação da sigmóide, seguindo o modelo Log-logístico proposto por Seefeldt et al. (1995). Estes parâmetros podem ser vistos na Tabela 7. A partir do estabelecimento dos parâmetros, foram determinados os valores de GR₅₀, apresentados na Tabela 8. A programação completa utilizada nas análises no programa SAS pode ser vistas no anexo B.

Tabela 7. Parâmetros da equação Log-logística para determinação da curva dose resposta

Espécie	Biótipo	D	C	GR ₅₀	B	R ²
<i>A. quitensis</i>	R	19,2500	56,05	22533	8231	0,98
<i>A. quitensis</i>	S	0,000566	100,1	11,2030	1,3669	0,99
<i>B. pilosa</i>	R	22,0833	88,7500	776,7	14,6161	0,98
<i>B. pilosa</i>	S	0,000566	100,1	6,0501	6,9656	0,99

Tabela 8. Valores de GR₅₀ para os biótipos resistentes e sensíveis de *A. quitensis* e *B. pilosa*

Espécie	GR ₅₀ Resistente (R)	GR ₅₀ Sensível (S)	R/S
<i>A. quitensis</i>	31553,06	12,80	2465,08
<i>B. pilosa</i>	158,87	0,17	934,52

A partir dos valores obtidos de GR₅₀ podemos determinar que os biótipos sensíveis de *A. quitensis* apresentaram susceptibilidade 2465 vezes menor ao herbicida Chlorimuron ethyl, que os biótipos resistentes. Em *B. pilosa*, os biótipos sensíveis apresentaram susceptibilidade 934 vezes menor ao herbicida Chlorimuron ethyl, que os biótipos resistentes.

Diebold e colaboradores (2003), observaram biótipos de *Amaranthus powellii* 109 vezes mais resistentes ao herbicida Imazethapyr (Imidazolinona) quando comparados biótipos sensíveis. Biótipos de *Amaranthus rudis* (Lovell et al., 1996) e *Amaranthus hybridus* (Poston et al., 2000) mostraram-se 520 e 1350

vezes, respectivamente, mais resistentes a este mesmo herbicida, comparando-se com os biótipos sensíveis. Burgos et al., (2001) determinaram a presença de biótipos 74 vezes mais resistentes ao herbicida Chlorimuron ethyl, dentro da população de *Amaranthus palmeri* estudada. Hanson et al., (2004) descreveram que biótipos sensíveis de *Camelina microcarpa* foram 1000 e 10000 vezes mais susceptíveis aos herbicidas metsulfuron e chlorsulfuron respectivamente, quando comparados a biótipos resistentes da mesma espécie.

Diante destes resultados, é possível confirmar a presença de biótipos resistentes, nas áreas produtoras de soja onde as sementes foram coletadas, selecionadas pelo uso repetitivo desta classe de herbicidas.

4.2 Análise da sequência completa do gene que codifica a enzima ALS

Através do seqüenciamento e alinhamento das amostras pela ferramenta CLUSTAL W (CLUSTAL W, 2004; Higgins et al., 1994), foi determinado que a região codificadora do gene da ALS na espécie *A. quitensis*, em ambos os biótipos, corresponde a 2010 nucleotídeos ou 669 aminoácidos (a sequência terminadora não foi contada como sendo um aminoácido). Na espécie *B. pilosa*, os biótipos sensíveis apresentaram a região codificadora do gene da ALS correspondendo a 1959 nucleotídeos ou 652 aminoácidos, enquanto os biótipos resistentes apresentaram a mesma região contendo 1935 nucleotídeos ou 644 aminoácidos.

Como citado por Duggleby & Pang, (2000), a sequência do gene da ALS em plantas, difere-se da sequência de bactérias e leveduras pela presença do peptídeo de trânsito na região N-terminal, que direciona a enzima para o cloroplasto. Através da ferramenta TARGET P, (TARGET P, 2004; Emanuelsson, 2000), a sequência dos 51 primeiros aminoácidos da enzima ALS foi predita como correspondente ao peptídeo de trânsito nas plantas de *A. quitensis*. Para as plantas de *B. pilosa*, foi predito como a sequência do peptídeo de trânsito os primeiros 48 aminoácidos para os biótipos sensíveis e os primeiros 66 aminoácidos para os biótipos resistentes. Também foi visualizada, nos alinhamentos, a sequência conservada de ligação da ThDP, descritas por Duggleby & Pang, (2000), iniciando com a trinca GDG (Glicina/Aspartato/Glicina), e terminando com dois aminoácidos Asparagina (NN), separados por 24 aminoácidos. Os alinhamentos completos estão apresentados nos anexos: C, D, E e F, deste trabalho.

As comparações das sequências de nucleotídeos obtidas, em relação ao banco de dados internacional (BLAST, 2004), demonstraram similaridade entre as sequências da região codificadora do gene da ALS das seguintes espécies vegetais: *A. quitensis*, *A. powellii* (n.º de acesso: AF363370), *A. blitoides* (n.º de acesso: AY124584), *A. retroflexus* (n.º de acesso: AF363369) e *Bassia scoparia* (n.º de acesso: AF094326), sendo o E-value igual a 0. O tamanho desta região variou entre 2010pb nas plantas do gênero *Amaranthus* (Diebold et al., 2003) e 2001pb em *B. scoparia* (Foes et al., 1998).

As seqüências da região codificadora do gene da ALS obtidas das plantas de *B. pilosa* demonstraram similaridade com as seqüências provenientes da mesma região nas espécies vegetais de *Xanthium sp.* (n.º de acesso: U16280), *Gossypium hirsutum* (n.º de acesso: Z46959) e *Raphanus raphanistrum* (n.º de acesso: AJ344990), demonstrando E-value também igual a 0. O tamanho da região codificadora, referente ao gene da ALS, apresentado na espécie *Xanthium sp.* foi de 1947pb (Bernasconi et al., 1995), enquanto que na espécie *G. hirsutum* o tamanho foi de 1980pb (Grula et al., 1995) e na espécie *R. raphanistrum* 1758pb (Tan & Medd, 2002).

4.2.1 Polimorfismo de nucleotídeos

A partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos, pelo programa CLUSTAL W (CLUSTAL W, 2004; Higgins et al., 1994), dos biótipos resistentes e sensíveis de *Amaranthus quitensis*, referentes à região codificadora do gene da ALS, foi observado o polimorfismo de apenas 2 nucleotídeos. A primeira alteração observada foi a substituição do nucleotídeo Timina (T 921), presente nos biótipos sensíveis, pelo nucleotídeo Adenina (A), nos biótipos resistentes. No entanto esta alteração não refletiu em substituição de aminoácidos na proteína, sendo explicada pelo fato do código genético ser degenerado. A outra substituição de nucleotídeos ocorreu na posição 1718, pela substituição do nucleotídeo Guanina (G), presente nos biótipos sensíveis, pelo nucleotídeo

Timina (T), podendo ser observada na Figura 7a. Diferentemente do caso anterior, esta alteração ocasionou na substituição do aminoácido Triptofano (W 573), nos biótipos sensíveis, pelo aminoácido Leucina (L), nos biótipos resistentes, dentro da região denominada domínio B.

Em relação ao alinhamento das seqüências da mesma região, provenientes de biótipo resistentes e sensíveis de *Bidens pilosa*, foi determinado o polimorfismo de 102 nucleotídeos, que resultaram na alteração de 24 aminoácidos. Dentre estas alterações foi observada a substituição do aminoácido Triptofano (W 556), presente nos biótipos sensíveis, pelo aminoácido Leucina, nos biótipos resistentes (Figura 7b), também na região do domínio B. Foi observada a deleção de 8 aminoácidos nas seqüências provenientes dos biótipos resistentes.

Figura 7 - Cromatogramas demonstrando a alteração de nucleotídeos e aminoácidos.

(a) Mutação na região do domínio B em *A. quitensis*. (b). Mutação no domínio B em *B. pilosa*

O alto grau de polimorfismo no gene da ALS foi descrito por Tan & Medd, (2002), onde se observou a variação de 81 nucleotídeos e 7 aminoácidos, no alinhamento da região codificadora do gene, em biótipos resistentes e sensíveis de *Raphanus raphanistrum* L.. Patzoldt et al. (2001), observaram o polimorfismo de 72 nucleotídeos, dentro de uma região de 688 pares de bases, entre o domínio A e o domínio B, em *Ambrósia artemisiifolia*. Em ambos os estudos foi

observada a substituição do aminoácido Triptofano pelo aminoácido Leucina, na região correspondente ao domínio B, conferindo resistência às sulfoniluréias e triazolopirimidinas respectivamente.

Por outro lado, Patzoldt e Tranel, (2002) encontraram apenas a substituição do aminoácido Triptofano (W 574) pelo aminoácido Leucina (L), dentro de uma região de 804 pares de base, também entre o domínio A e B, em biótipos resistentes de *Ambrosia trifida*. Esta alteração também conferiu resistência às triazolopirimidinas.

Foi observado polimorfismo entre os biótipos resistentes e sensíveis de *B. pilosa*. Estas variações encontradas podem estar acontecendo pela própria diferença entre os biótipos ou por diferenças entre as espécies estudadas. Durante o experimento não foram observadas variações morfológicas entre os biótipos, no entanto, Grombone-Guarantini e Solferino, (2004), determinam que critérios baseados apenas na morfologia não possibilitam a classificação exata das espécies do gênero *Bidens* (*B. pilosa*, *B. subalternans*, *B. Alba*), necessitando para isso, abordagens como contagem cromossomal e análise de isoenzimas. Assim sendo, apenas o isolamento e seqüenciamento do gene da ALS em biótipos comprovados de *B. subalternans* e *B. alba* poderiam eliminar esta hipótese.

Quanto a causa da resistência aos herbicidas inibidores da ALS, apresentada por biótipos selecionados dentro das populações de *A. quitensis* e *B. pilosa*, fica demonstrada como principal evidência a alteração do aminoácido Triptofano (W) pelo aminoácido Leucina (L), na região do domínio B. A

alteração da proteína nesta posição já foi observada em diversos trabalhos com biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (Bernasconi et al., 1995; Foes et al., 1998; Foes et al. 1999; Boutsalis et al., 1999; Patzoldt, et al., 2001; Patzoldt, et al., 2002; Tan & Medd, 2002; Sibony e Rubin, 2003 e Hanson et al., 2004).

Estudos recentes com o gene da ALS em leveduras observaram a relação direta deste resíduo com a ligação, junto à enzima, das moléculas do herbicidas da classe das sulfoniluréias (Pang et al., 2003; Duggleby et al., 2003). Estes trabalhos sugerem que o aminoácido Triptofano teria a função de acoplar as moléculas do herbicida junto à enzima, bloqueando assim, o canal de acesso entre os cofatores e o sítio ativo da proteína, causando a morte da planta. A substituição deste aminoácido pelo aminoácido Leucina, causaria a perda das ligações com o anel pirimidil das moléculas do herbicida, liberando o acesso dos cofatores ao sítio ativo e possibilitando a catalisação das reações normalmente.

4.3 Transformação de plantas de tabaco, via *Agrobacterium tumefaciens*

Plasmídeos binários, pCAMBIA 1302, foram modificados para a inserção da região codificadora do gene da ALS, provenientes de biótipos sensíveis (pAL 54, pAL 56) e biótipos resistentes (pAL 55 e pAL 57) de *A. quitensis* e biótipos sensíveis (pAL 58 e pAL 60) e biótipos resistentes (pAL 59 e pAL 61) de *B.*

pilosa, no genoma de tabaco (*Nicotiana tabacum*), por transformação com *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 8).

Figura 8 – Representação esquemática do plasmídeo binário pAL58 e suas estruturas.

A região descrita como ALS representa o ponto de inserção do gene da ALS dos biótipos resistentes e sensíveis de *A. quitensis* e *B. pilosa*

As bactérias da espécie *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com os plasmídeos descritos acima foram analisadas para a confirmação das colônias transformadas pela extração do DNA plasmidial e digestão com as enzimas *Bgl* II e *Spe* I, como mostra a Figura 9. Como controles foram utilizadas amostras não digeridas (canaletas 2 e 16), o plasmídeo pCAMBIA, linearizado pela digestão com as enzimas *Bgl* II e *Spe* I, sem o inserto

(canaletas 3 e 17) e a digestão utilizando as mesmas enzimas do plasmídeo pAL 54 (extraído de células de *E. coli*) como controle positivo, (canaleta 30).

Figura 9 - Digestão dos plasmídeos binários extraídos de colônias transformadas de *Agrobacterium tumefaciens*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, a 3,6 V/cm

1- 1 Kb Ladder	9- pAL 60- Colônia 3	17- Clone não digerido	25- pAL 56- Colônia 2
2- pCAMBIA Linear	10- pAL 60- Colônia 4	18- pAL 54- Colônia 2	26- pAL 56- Colônia 3
3- Clone não digerido	11- pAL 60- Colônia 5	19- pAL 55- Colônia 1	27- pAL 56- Colônia 4
4- pAL 58	12- pAL 61- Colônia 1	20- pAL 55- Colônia 2	28- pAL 57- Colônia 1
5- pAL 59- Colônia 1	13- pAL 61- Colônia 2	21- pAL 55- Colônia 3	29- pAL 57- Colônia 2
6- pAL 59- Colônia 2	14- pAL 54- Colônia 1	22- pAL 55- Colônia 4	30- pAL 54 Controle +
7- pAL 60- Colônia 1	15- 1 Kb Ladder	23- pAL 55- Colônia 5	
8- pAL 60- Colônia 2	16- pCAMBIA Linear	24- pAL 56- Colônia 1	

Foram transformados discos foliares de tabaco (Figura 10) e até o momento foram obtidas quatro plântulas regeneradas em meio de cultura contendo higromicina como agente de seleção, sendo 3 delas possivelmente contendo o gene da ALS do biótipo resistente de *B. pilosa* e 1 possivelmente contendo o gene da ALS do biótipo sensível de *A. quitensis*. Devido a estas plântulas ainda não terem atingido tamanho adequado para coleta de tecido suficiente para a extração de DNA, não podemos confirmar os transformantes por PCR e southern blot.

(a)

(b)

Figura 10 – Experimento de transformação de discos foliares de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*. (a). Inoculação dos discos foliares. (b). Regeneração de plantas de tabaco

A transformação de plantas de tabaco com o gene da ALS, para estudos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS, foi descrita primeiramente por Haughn et al., (1988), utilizando o gene *csr1-1* isolado de mutantes de *Arabidopsis thaliana* resistente às sulfoniluréias. Brandle e Miki, (1993) avaliaram a performance agrônômica de plantas de tabaco resistentes ao herbicida chlorsulfuron, transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, com o mesmo gene *csr1-1* proveniente de *Arabidopsis thaliana*. Assim sendo, este modelo biológico parece ser muito adequado para este tipo de abordagem.

A confirmação da transferência da resistência pela introdução do gene da ALS, provenientes dos biótipos resistentes das espécies *A. quitensis* e *B. pilosa*, no genoma do tabaco, nos abrirá a possibilidade de sua utilização para a transformação de espécies de interesse comercial. Atualmente esta é uma prática que vem sendo muito utilizada na biotecnologia agrícola, beneficiando produtores e reduzindo a utilização de herbicidas nas lavouras.

Outra possibilidade é a utilização deste gene como um marcador seletivo dominante nos experimentos de transformação genética, substituindo os genes que conferem resistência a antibióticos. Andersson et al. (2003) utilizaram com sucesso o gene da ALS mutado (S653N) de *Arabidopsis thaliana*, como marcador seletivo em experimentos de transformação de batatas. Estudos comparativos entre a utilização do gene da ALS e do gene *nptII* (responsável por conferir resistência ao antibiótico canamicina) como marcadores seletivos, demonstraram a mesma eficiência na seleção dos transformantes. Kovar et al. (2002) utilizaram o gene da ALS proveniente de *Chlamydomonas reinhardtii*

também como um marcador seletivo dominante, obtendo sucesso em experimentos de transformação genética.

Gressel, (2000), lembra que nem todas as aplicações de genes que codificam proteínas alvo à ação de herbicidas são comerciais. Em seu estudo ele aponta a utilização destes genes na taxonomia molecular de espécies do gênero *Amaranthus*, possibilitando a classificação de espécies similares do mesmo gênero ou híbridos. O autor também enfatiza a importância dos estudos moleculares para a descoberta de novos alvos e o desenvolvimento de novos herbicidas.

5 CONCLUSÃO

- A. Foi confirmada a presença de biótipos resistentes ao herbicida inibidor da ALS, Chlorimuron ethyl (Sulfoniluréia), dentro das populações de *Amaranthus quitensis* e *Bidens pilosa*, nas áreas coletadas.
- B. O experimento de curva dose-resposta determinou que os biótipos sensíveis apresentaram susceptibilidade 2465 e 934 vezes menor, ao herbicida Chlorimuron ethyl, que os biótipos resistentes de *A. quitensis* e *B. pilosa*, respectivamente.
- C. A região codificadora do gene da ALS foi totalmente amplificada, clonada e seqüenciada em ambas as espécies. Foi determinado que esta região é compreendida por 2010pb nos biótipos resistentes e sensíveis de *A. quitensis*, 1959pb nos biótipos sensíveis e 1935pb nos biótipos resistentes de *B. pilosa*.

- D. A partir do seqüenciamento da região codificadora do gene da ALS, foi observada a alteração, na região do domínio B, do aminoácido Triptofano (W), presente nos biótipos sensíveis, pelo aminoácido Leucina (L), nos biótipos resistentes. Como confirmada pela literatura, esta alteração é a responsável pela resistência dos biótipos ao herbicida Chlorimuron ethyl.
- E. Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) foram transformadas, via *Agrobacterium tumefaciens*, com os plasmídeos contendo a região codificadora do gene da ALS, de ambas as espécies, com a finalidade de observarmos a transferência da resistência. No entanto, estas plântulas ainda não adquiriram crescimento suficiente para confirmação da transformação.

ANEXOS

Anexo A

Notas atribuídas aos tratamentos das plantas, com o herbicida Chlorimuron ethyl, durante o intervalo de 14, 21 e 28 dias após aplicação do produto.

Primeira avaliação das plantas de *Bidens pilosa*, 14 dias após a aplicação do herbicida, onde R corresponde aos biótipos resistentes e S aos biótipos sensíveis.

Trat.	Dose (g .i.a/ha)	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
		R	S	R	S	R	S	R	S
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8,0	20	90	15	85	15	90	20	85
3	80,0	30	95	25	90	30	95	30	95
4	800,0	40	100	45	100	45	100	40	100
5	8000,0	50	100	55	100	60	100	55	100

Segunda avaliação das plantas de *Bidens pilosa*, 21 dias após a aplicação do herbicida.

Trat	Dose (g .i.a/ha)	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
		R	S	R	S	R	S	R	S
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8,0	20	80	15	85	15	80	20	85
3	80,0	30	100	30	100	30	100	30	95
4	800,0	40	100	45	100	45	100	45	100
5	8000,0	60	100	65	100	70	100	60	100

Terceira avaliação das plantas de *Bidens pilosa*, 28 dias após a aplicação do herbicida.

Trat	Dose (g .i.a/ha)	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
		R	S	R	S	R	S	R	S
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8,0	20	85	25	90	30	85	25	90
3	80,0	40	100	40	100	45	100	40	100
4	800,0	60	100	65	100	60	100	65	100
5	8000,0	80	100	85	100	90	100	100	100

Primeira avaliação das plantas de *Amaranthus quitensis*, 14 dias após a aplicação do herbicida.

Trat.	Dose (g .i.a/ha)	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
		R	S	R	S	R	S	R	S
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8,0	5	15	5	20	5	15	5	15
3	80,0	10	30	10	30	15	35	10	35
4	800,0	20	60	25	60	25	65	25	70
5	8000,0	40	80	35	85	40	90	40	80

Segunda avaliação das plantas de *Amaranthus quitensis*, 21 dias após a aplicação do herbicida.

Trat.	Dose (g .i.a/ha)	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
		R	S	R	S	R	S	R	S
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8,0	5	20	5	20	5	15	5	15
3	80,0	10	40	10	35	15	40	10	40
4	800,0	25	70	30	75	30	70	30	75
5	8000,0	40	100	35	90	40	90	40	100

Terceira avaliação das plantas de *Amaranthus quitensis*, 28 dias após a aplicação do herbicida.

Trat.	Dose (g .i.a/ha)	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
		R	S	R	S	R	S	R	S
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8,0	5	30	10	40	5	45	5	40
3	80,0	15	100	15	100	20	100	15	100
4	800,0	30	100	35	100	30	100	30	100
5	8000,0	40	100	45	100	45	100	40	100

Anexo B

Procedimento utilizado no pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System), para realização do teste de Tukey. Os dados (CARDS) foram substituídos para cada biótipo e espécie.

```
data AmaranthusR;
input trat $ CONTROLE;
cards;
1      0
1      0
1      0
1      0
2      5
2      5
2      5
2      10
3      15
3      15
3      15
3      20
4      30
4      30
4      30
4      35
5      40
5      40
5      45
5      45
;
proc print;
run;

proc glm;
class trat;
model CONTROLE=trat;
means trat/TUKEY;
Run;
```

Procedimento utilizado no pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System), para obtenção dos parâmetros estatísticos do modelo Log-logístico descrito por Seefeldt, et al.,(1995). Os dados (CARDS) foram substituídos para cada biótipo e espécie.

```
DATA amarantr;
INPUT dose rep contr;
IF dose>0 THEN logdose=LOG(dose);
ELSE logdose=LOG(0.0001);
CARDS;
0      1      0
0      2      0
0      3      0
0      4      0
8      1      5
8      2      10
.
.
.

800    1      30
800    2      35
800    3      30
800    4      30
8000   1      40
8000   2      45
8000   3      45
8000   4      40
;
RUN;
PROC GLM DATA=amarantr;
CLASS dose;
MODEL contr=dose
      /SS1 SS2 SOLUTION;
RUN;
PROC NLIN DATA=amarantr;
PARAMETERS
d=100
c=0
Gr50=8000
b=2
;
IF dose=0 THEN predict=d;
ELSE predict=c+(d-c)/(1+EXP (b*(logdose-LOG(gr50))));
MODEL contr=predict;
RUN;
```


Anexo C

Alinhamento das seqüências de nucleotídeos, da região codificadora do gene da ALS, em biótipos sensíveis (ASM 6, 7, 8, 9, 10) e resistentes (ARM 6, 7, 8, 9, 10) aos herbicidas inibidores da ALS em *Amaranthus quitensis*.

```

ASM-6   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ASM-7   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ASM-8   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ASM-9   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ASM-10  ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ARM-6   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ARM-7   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ARM-8   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ARM-9   ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
ARM-10  ATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCT 60
*****

ASM-6   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ASM-7   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ASM-8   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ASM-9   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ASM-10  AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ARM-6   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ARM-7   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ARM-8   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ARM-9   AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
ARM-10  AATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTTTTCCAATTCTCTTAAACCCACTTCTTCT 120
*****

ASM-6   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ASM-7   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ASM-8   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ASM-9   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ASM-10  TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ARM-6   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ARM-7   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ARM-8   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ARM-9   TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
ARM-10  TCTTCAATCCTCCGCCGCCCTCTTCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCT 180
*****

ASM-6   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ASM-7   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ASM-8   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ASM-9   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ASM-10  AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ARM-6   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ARM-7   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ARM-8   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ARM-9   AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
ARM-10  AAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCGTCTCTCACCAGATGATAAACCTCT 240
*****

```

ASM-6 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ASM-7 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ASM-8 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ASM-9 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ASM-10 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ARM-6 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ARM-7 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ARM-8 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ARM-9 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300
 ARM-10 TCTTTTGTTCCTCCGATTTAGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAA 300

ASM-6 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ASM-7 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ASM-8 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ASM-9 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ASM-10 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ARM-6 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ARM-7 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ARM-8 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ARM-9 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360
 ARM-10 GCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAA 360

ASM-6 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ASM-7 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ASM-8 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ASM-9 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ASM-10 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ARM-6 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ARM-7 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ARM-8 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ARM-9 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420
 ARM-10 ATTCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAA 420

ASM-6 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ASM-7 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ASM-8 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ASM-9 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ASM-10 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ARM-6 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ARM-7 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ARM-8 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ARM-9 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480
 ARM-10 GGTGGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATT 480

ASM-6 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ASM-7 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ASM-8 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ASM-9 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ASM-10 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ARM-6 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ARM-7 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ARM-8 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ARM-9 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540
 ARM-10 GCCACTTCTGGTCCAGGTGCTACTAATCTTGTTTCTGGTCTTGCTGATGCACTTCTTGAC 540

ASM-6 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ASM-7 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ASM-8 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ASM-9 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ASM-10 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ARM-6 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ARM-7 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ARM-8 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ARM-9 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600
 ARM-10 TCAGTCCCTCTTGTGCGCCATTACTGGGCAAGTTCCCCGGCGTATGATTGGTACTGATGCT 600

ASM-6 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ASM-7 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ASM-8 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ASM-9 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ASM-10 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ARM-6 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ARM-7 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ARM-8 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ARM-9 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660
 ARM-10 TTTCAAGAGACTCCAATTGTTGAGGTAACCTCGATCCATTACCAAGCATAATTATTTGGTG 660

ASM-6 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ASM-7 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ASM-8 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ASM-9 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ASM-10 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ARM-6 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ARM-7 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ARM-8 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ARM-9 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720
 ARM-10 TTAGATGTTGAGGATATTCCTAGAATTGTTAAGGAAGCTTTCTTTTGTAGCTAATTCTGGT 720

ASM-6 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ASM-7 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ASM-8 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ASM-9 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ASM-10 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ARM-6 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ARM-7 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ARM-8 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ARM-9 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780
 ARM-10 AGACCTGGACCTGTTTTGATTGATATTCCTAAAGATATTCAGCAACAATTAGTTGTTCCCT 780

ASM-6 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ASM-7 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ASM-8 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ASM-9 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ASM-10 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ARM-6 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ARM-7 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ARM-8 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ARM-9 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840
 ARM-10 AATTGGGAACAGCCCATTAATTGGGTGGGTATCTTTCTAGGTTGCCTAAACCCACTTAT 840

```

ASM-6   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ASM-7   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ASM-8   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ASM-9   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ASM-10  TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ARM-6   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ARM-7   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ARM-8   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ARM-9   TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
ARM-10  TCTGCTAATGAAGAGGGACTTCTTGATCAAATTGTAAGGTTAGTGGGTGAGTCTAAGAGA 900
*****

ASM-6   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ASM-7   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ASM-8   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ASM-9   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ASM-10  CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ARM-6   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ARM-7   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ARM-8   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ARM-9   CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
ARM-10  CCTGTGCTGTATACTGGAGGTGGGTGTTTGAATTCTAGTGAAGAATTGAGGAAATTTGTC 960
*****

ASM-6   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ASM-7   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ASM-8   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ASM-9   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ASM-10  GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ARM-6   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ARM-7   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ARM-8   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ARM-9   GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
ARM-10  GAATTGACAGGTATTCCGGTGGCTAGTACTTTAATGGGGTTGGGGGCTTTCCCTTGTA 1020
*****

ASM-6   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ASM-7   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ASM-8   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ASM-9   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ASM-10  GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ARM-6   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ARM-7   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ARM-8   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ARM-9   GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
ARM-10  GATGATTTATCTCTTCATATGTTGGGAATGCACGGGACTGTGTACGCGAATTACGCGGTT 1080
*****

ASM-6   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ASM-7   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ASM-8   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ASM-9   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ASM-10  GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ARM-6   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ARM-7   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ARM-8   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ARM-9   GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
ARM-10  GATAAGGCCGATTTGTTGCTTGCTTTTGGGGTTAGGTTTGATGATCGAGTGACTGGTAAG 1140
*****

```

ASM-6 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ASM-7 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ASM-8 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ASM-9 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ASM-10 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ARM-6 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ARM-7 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ARM-8 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ARM-9 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200
 ARM-10 CTCGAGGCGTTTGCTAGCCGGGCTAAGATTGTGCACATCGATATCGATTCTGCTGAAATC 1200

ASM-6 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ASM-7 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ASM-8 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ASM-9 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ASM-10 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ARM-6 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ARM-7 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ARM-8 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ARM-9 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260
 ARM-10 GGGGAAGAATAAGCAACCTCATGTGTCGATTTGTGGTGATGTTAAAGTGGCATTACAGGGG 1260

ASM-6 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ASM-7 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ASM-8 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ASM-9 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ASM-10 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ARM-6 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ARM-7 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ARM-8 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ARM-9 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320
 ARM-10 TTGAATAAGATTTTGAATCTAGAAAAGGAAAGGTGAAATTGGATTTCCTAATTGGAGG 1320

ASM-6 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ASM-7 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ASM-8 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ASM-9 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ASM-10 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ARM-6 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ARM-7 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ARM-8 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ARM-9 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380
 ARM-10 GAGGAGTTGAATGAGCAGAAAAAGAAGTTTCCTTTGAGTTTTAAGACTTTCGGGGATGCA 1380

ASM-6 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ASM-7 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ASM-8 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ASM-9 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ASM-10 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ARM-6 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ARM-7 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ARM-8 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ARM-9 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440
 ARM-10 ATTCCCTCCGCAATACGCCATTACAGGTTCTTGACGAGTTGACGAAGGGCGATGCGGTTGTA 1440

ASM-6 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ASM-7 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ASM-8 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ASM-9 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ASM-10 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ARM-6 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ARM-7 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ARM-8 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ARM-9 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500
 ARM-10 AGTACTGGTGTGGGCGACACCAAATGTGGGCTGCCCAATTCTATAAGTACCGAAATCCT 1500

ASM-6 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ASM-7 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ASM-8 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ASM-9 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ASM-10 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ARM-6 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ARM-7 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ARM-8 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ARM-9 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560
 ARM-10 CGCCAATGGCTGACCTCGGGTGGTTTGGGGGCTATGGGGTTTGGTCTACCAGCTGCTATT 1560

ASM-6 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ASM-7 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ASM-8 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ASM-9 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ASM-10 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ARM-6 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ARM-7 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ARM-8 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ARM-9 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620
 ARM-10 GGAGCTGCTGTTGCTCGACCAGATGCGGTGGTTGTAGACATTGATGGGGATGGGAGTTTT 1620

ASM-6 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ASM-7 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ASM-8 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ASM-9 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ASM-10 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ARM-6 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ARM-7 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ARM-8 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ARM-9 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680
 ARM-10 ATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACGATTAGGGTAGAGAATCTCCCGGTTAAATCATG 1680

ASM-6 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ASM-7 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ASM-8 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ASM-9 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ASM-10 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ARM-6 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ARM-7 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ARM-8 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ARM-9 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740
 ARM-10 CTCTTGAACAAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCAATGGGAAGATCGATTTTACAAAGCT 1740

ASM-6 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ASM-7 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ASM-8 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ASM-9 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ASM-10 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ARM-6 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ARM-7 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ARM-8 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ARM-9 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800
 ARM-10 AACCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCTTCCAATTCTTCCGAAATCTTCCCGGATATG 1800

ASM-6 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ASM-7 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ASM-8 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ASM-9 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ASM-10 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ARM-6 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ARM-7 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ARM-8 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ARM-9 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860
 ARM-10 CTCAAATTTGCTGAAGCATGTGATATACCAGCAGCCCGTGTACCAAGGTGAGCGATTTA 1860

ASM-6 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ASM-7 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ASM-8 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ASM-9 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ASM-10 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ARM-6 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ARM-7 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ARM-8 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ARM-9 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920
 ARM-10 AGGGCTGCAATTCAAACAATGTTGGATACTCCAGGACCGTATCTGCTGGATGTAATCGTA 1920

ASM-6 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ASM-7 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ASM-8 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ASM-9 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ASM-10 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ARM-6 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ARM-7 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ARM-8 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ARM-9 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980
 ARM-10 CCACATCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCTAGCGGTGCCGCCCTCAAGGACACCATA 1980

ASM-6 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ASM-7 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ASM-8 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ASM-9 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ASM-10 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ARM-6 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ARM-7 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ARM-8 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ARM-9 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010
 ARM-10 ACAGAGGGTGATGGAAGAAGGGCTTATTAG 2010

Anexo D

Alinhamento das seqüências de aminoácidos, da região codificadora do gene da ALS, em biótipos sensíveis (ASM 6, 7, 8, 9, 10) e resistentes (ARM 6, 7, 8, 9, 10) aos herbicidas inibidores da ALS em *Amaranthus quitensis*. Regiões sublinhadas correspondem aos domínios conservados da proteína. Regiões sombreadas correspondem ao peptídeo de trânsito e ao domínio de ligação do Mg^{2+} e Tiamina difosfato respectivamente. Letras W e L em negrito correspondem à alteração do aminoácido Triptofano (W) pelo aminoácido Leucina (L), responsável pela resistência.

Peptídeo de Trânsito	
ASM-6	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ASM-7	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ASM-8	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ASM-9	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ASM-10	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ARM-6	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ARM-7	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ARM-8	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ARM-9	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60
ARM-10	MASTSSNPPFSSSTTKPNKIPNLOSSLYAIPFNSNLKPTSSSSILRRPLOTSSSSSQSPKP 60

Dom. C	
ASM-6	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ASM-7	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ASM-8	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ASM-9	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ASM-10	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ARM-6	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ARM-7	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ARM-8	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ARM-9	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120
ARM-10	KPPSATITQSPSSLTDDKPSSFVSRFSPEEPRKGCVDLVEALEREVTDVFAYPGGASME 120

ASM-6 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ASM-7 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ASM-8 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ASM-9 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ASM-10 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ARM-6 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ARM-7 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ARM-8 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ARM-9 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180
 ARM-10 IHQALTRSNIIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVCIAATSGPGATNLVSGLADALLD 180

Dom. A Dom. D

ASM-6 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ASM-7 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ASM-8 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ASM-9 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ASM-10 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ARM-6 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ARM-7 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ARM-8 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ARM-9 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240
 ARM-10 SVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVKEAFFLANSG 240

ASM-6 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ASM-7 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ASM-8 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ASM-9 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ASM-10 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ARM-6 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ARM-7 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ARM-8 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ARM-9 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300
 ARM-10 RGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWEQPIKLGGLSRLPKPTYSANEEGLLDQIVRLVGESKR 300

ASM-6 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ASM-7 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ASM-8 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ASM-9 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ASM-10 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ARM-6 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ARM-7 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ARM-8 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ARM-9 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360
 ARM-10 PVLYTGGGCLNSSEELRKFFVELTGIPVASTLMGLGAFPCTDDLSLHMLGMHGTVYANYAV 360

ASM-6 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ASM-7 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ASM-8 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ASM-9 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ASM-10 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ARM-6 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ARM-7 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ARM-8 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ARM-9 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420
 ARM-10 DKADLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNKQPHVSI CGDVKVALQG 420

ASM-6 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ASM-7 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ASM-8 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ASM-9 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ASM-10 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ARM-6 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ARM-7 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ARM-8 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ARM-9 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480
 ARM-10 LNKILES SRKGKVKLDFSNWREELNEQKKKFPLSFKTFGDAIPPQYAIQVLDELTKGDAVV 480

ASM-6 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ASM-7 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ASM-8 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ASM-9 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ASM-10 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ARM-6 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ARM-7 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ARM-8 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ARM-9 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540
 ARM-10 STGVGQHQMWAQFYKYRNPQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGA AAVARPD AVVV DIDDGCSF 540

Dom. B

ASM-6 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ASM-7 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ASM-8 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ASM-9 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ASM-10 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ARM-6 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ARM-7 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ARM-8 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ARM-9 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600
 ARM-10 IMNVQELATIRVENLPVKIMLLNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPNSNSEIFPDM 600

Dom. E

ASM-6 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ASM-7 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ASM-8 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ASM-9 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ASM-10 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ARM-6 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ARM-7 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ARM-8 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ARM-9 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660
 ARM-10 LKFAEACDIPAARVTKVSDLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA AFKDTI 660

ASM-6 TEGDGRRAY 669
 ASM-7 TEGDGRRAY 669
 ASM-8 TEGDGRRAY 669
 ASM-9 TEGDGRRAY 669
 ASM-10 TEGDGRRAY 669
 ARM-6 TEGDGRRAY 669
 ARM-7 TEGDGRRAY 669
 ARM-8 TEGDGRRAY 669
 ARM-9 TEGDGRRAY 669
 ARM-10 TEGDGRRAY 669

Anexo E

Alinhamento das seqüências de nucleotídeos, da região codificadora do gene da ALS, em biótipos sensíveis (BSM 1, 2, 3, 4, 5) e resistentes (BRM 1, 2, 3, 4, 5) aos herbicidas inibidores da ALS em *Bidens pilosa*.

```

BSM-1  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACACCACCACCGTCCCACCACCATCATCCACC  60
BSM-2  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACACCACCACCGTCCCACCACCATCATCCACC  60
BSM-3  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACACCACCACCGTCCCACCACCATCATCCACC  60
BSM-4  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACACCACCACCGTCCCACCACCATCATCCACC  60
BSM-5  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACACCACCACCGTCCCACCACCATCATCCACC  60
BRM-1  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACATCACCACCACCGTCCCACCACCATCCACC  60
BRM-2  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACATCACCACCACCGTCCCACCACCATCCACC  60
BRM-3  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACATCACCACCACCGTCCCACCACCATCCACC  60
BRM-4  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACATCACCACCACCGTCCCACCACCATCCACC  60
BRM-5  ATGGCGGCTCTCACTCCTTCAAACCCCTCACATCACCACCACCGTCCCACCACCATCCACC  60
***** * *****

BSM-1  ACCACCACCATCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAC  120
BSM-2  ACCACCACCATCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAC  120
BSM-3  ACCACCACCATCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAC  120
BSM-4  ACCACCACCATCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAC  120
BSM-5  ACCACCACCATCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAC  120
BRM-1  GCCACCA---TCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAT  117
BRM-2  GCCACCA---TCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAT  117
BRM-3  GCCACCA---TCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAT  117
BRM-4  GCCACCA---TCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAT  117
BRM-5  GCCACCA---TCCTCCACCGCTTCACATTCCCAGTCCACCCACACCCCCAAAACGACAT  117
*****

BSM-1  CGTCTTGTTATCTCCAATGTTCTTTCCAATTCCAAACCCACACCCACCACCCTATAACC  180
BSM-2  CGTCTTGTTATCTCCAATGTTCTTTCCAATTCCAAACCCACACCCACCACCCTATAACC  180
BSM-3  CGTCTTGTTATCTCCAATGTTCTTTCCAATTCCAAACCCACACCCACCACCCTATAACC  180
BSM-4  CGTCTTGTTATCTCCAATGTTCTTTCCAATTCCAAACCCACACCCACCACCCTATAACC  180
BSM-5  CGTCTTGTTATCTCCAATGTTCTTTCCAATTCCAAACCCACACCCACCACCCTATAACC  180
BRM-1  CGTCTTGCTATCTCCAATGTTCTTTCCAA-----ACCCACACCCAC-----TATAACC  165
BRM-2  CGTCTTGCTATCTCCAATGTTCTTTCCAA-----ACCCACACCCAC-----TATAACC  165
BRM-3  CGTCTTGCTATCTCCAATGTTCTTTCCAA-----ACCCACACCCAC-----TATAACC  165
BRM-4  CGTCTTGCTATCTCCAATGTTCTTTCCAA-----ACCCACACCCAC-----TATAACC  165
BRM-5  CGTCTTGCTATCTCCAATGTTCTTTCCAA-----ACCCACACCCAC-----TATAACC  165
*****

BSM-1  CATCCCCCTACCGCTACCCCGTTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGCAAAGGC  240
BSM-2  CATCCCCCTACCGCTACCCCGTTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGCAAAGGC  240
BSM-3  CATCCCCCTACCGCTACCCCGTTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGCAAAGGC  240
BSM-4  CATCCCCCTACCGCTACCCCGTTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGCAAAGGC  240
BSM-5  CATCCCCCTACCGCTACCCCGTTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGCAAAGGC  240
BRM-1  CATCCCGTTACCCCCACTCCGGTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGAAAAGGC  225
BRM-2  CATCCCGTTACCCCCACTCCGGTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGAAAAGGC  225
BRM-3  CATCCCGTTACCCCCACTCCGGTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGAAAAGGC  225
BRM-4  CATCCCGTTACCCCCACTCCGGTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGAAAAGGC  225
BRM-5  CATCCCGTTACCCCCACTCCGGTGCCCGCTCGTTTCGCCCTGACCAGCCCCGAAAAGGC  225
*****

```

BSM-1 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCG 300
 BSM-2 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCG 300
 BSM-3 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCG 300
 BSM-4 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCG 300
 BSM-5 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCG 300
 BRM-1 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCA 285
 BRM-2 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCA 285
 BRM-3 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCA 285
 BRM-4 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCA 285
 BRM-5 TCCGACGTCCTCGTCGAAGCCTTGAACGCGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCCTACCCA 285

BSM-1 GGAGGGGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCACACCATCCGAAACATC 360
 BSM-2 GGAGGGGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCACACCATCCGAAACATC 360
 BSM-3 GGAGGGGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCACACCATCCGAAACATC 360
 BSM-4 GGAGGGGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCACACCATCCGAAACATC 360
 BSM-5 GGAGGGGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCACACCATCCGAAACATC 360
 BRM-1 GGGGGCGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCCAAACCATCCGAAACATC 345
 BRM-2 GGGGGCGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCCAAACCATCCGAAACATC 345
 BRM-3 GGGGGCGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCCAAACCATCCGAAACATC 345
 BRM-4 GGGGGCGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCCAAACCATCCGAAACATC 345
 BRM-5 GGGGGCGCCTCAATGGAGATCCACCAAGCCTTAACCCGGTCCCAAACCATCCGAAACATC 345
 ** ** *****

BSM-1 CTCCCGCGCCACGAACAAGGTGGTGTCTTCGCGGCCGAAGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 420
 BSM-2 CTCCCGCGCCACGAACAAGGTGGTGTCTTCGCGGCCGAAGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 420
 BSM-3 CTCCCGCGCCACGAACAAGGTGGTGTCTTCGCGGCCGAAGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 420
 BSM-4 CTCCCGCGCCACGAACAAGGTGGTGTCTTCGCGGCCGAAGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 420
 BSM-5 CTCCCGCGCCACGAACAAGGTGGTGTCTTCGCGGCCGAAGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 420
 BRM-1 CTCCCGCGCCACGAACAAGGCGGTGTCTTCGCGGCCGAGGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 405
 BRM-2 CTCCCGCGCCACGAACAAGGCGGTGTCTTCGCGGCCGAGGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 405
 BRM-3 CTCCCGCGCCACGAACAAGGCGGTGTCTTCGCGGCCGAGGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 405
 BRM-4 CTCCCGCGCCACGAACAAGGCGGTGTCTTCGCGGCCGAGGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 405
 BRM-5 CTCCCGCGCCACGAACAAGGCGGTGTCTTCGCGGCCGAGGGCTACGCACGCGCCTCGGGT 405

BSM-1 TTACCCGGGGTGTGCATAGCCACTTCTGGCCCCGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 480
 BSM-2 TTACCCGGGGTGTGCATAGCCACTTCTGGCCCCGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 480
 BSM-3 TTACCCGGGGTGTGCATAGCCACTTCTGGCCCCGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 480
 BSM-4 TTACCCGGGGTGTGCATAGCCACTTCTGGCCCCGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 480
 BSM-5 TTACCCGGGGTGTGCATAGCCACTTCTGGCCCCGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 480
 BRM-1 AAACCGGGCGTGTGCATAGCCACTTCGGGCCCGGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 465
 BRM-2 AAACCGGGCGTGTGCATAGCCACTTCGGGCCCGGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 465
 BRM-3 AAACCGGGCGTGTGCATAGCCACTTCGGGCCCGGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 465
 BRM-4 AAACCGGGCGTGTGCATAGCCACTTCGGGCCCGGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 465
 BRM-5 AAACCGGGCGTGTGCATAGCCACTTCGGGCCCGGAGCCACCAATTTGGTCAGTGGCTTA 465
 *** ** *****

BSM-1 GCTGATGCATTGCTAGATAGTGTTCCTATGGTTGCCATCACCAGGTACAGTCCCGAGGCGT 540
 BSM-2 GCTGATGCATTGCTAGATAGTGTTCCTATGGTTGCCATCACCAGGTACAGTCCCGAGGCGT 540
 BSM-3 GCTGATGCATTGCTAGATAGTGTTCCTATGGTTGCCATCACCAGGTACAGTCCCGAGGCGT 540
 BSM-4 GCTGATGCATTGCTAGATAGTGTTCCTATGGTTGCCATCACCAGGTACAGTCCCGAGGCGT 540
 BSM-5 GCTGATGCATTGCTAGATAGTGTTCCTATGGTTGCCATCACCAGGTACAGTCCCGAGGCGT 540
 BRM-1 GCTGATGCATTATTAGACAGTGTTCCTAATGGTTGCCATCACCAGGTCAGTCCCGAGGCGA 525
 BRM-2 GCTGATGCATTATTAGACAGTGTTCCTAATGGTTGCCATCACCAGGTCAGTCCCGAGGCGA 525
 BRM-3 GCTGATGCATTATTAGACAGTGTTCCTAATGGTTGCCATCACCAGGTCAGTCCCGAGGCGA 525
 BRM-4 GCTGATGCATTATTAGACAGTGTTCCTAATGGTTGCCATCACCAGGTCAGTCCCGAGGCGA 525
 BRM-5 GCTGATGCATTATTAGACAGTGTTCCTAATGGTTGCCATCACCAGGTCAGTCCCGAGGCGA 525

BSM-1 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 600
 BSM-2 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 600
 BSM-3 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 600
 BSM-4 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 600
 BSM-5 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 600
 BRM-1 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 585
 BRM-2 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 585
 BRM-3 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 585
 BRM-4 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 585
 BRM-5 ATGATCGGGACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCATTGTGCGAGGTAACCCGGTCTATCACT 585
 ***** ** *****

BSM-1 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 660
 BSM-2 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 660
 BSM-3 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 660
 BSM-4 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 660
 BSM-5 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 660
 BRM-1 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 645
 BRM-2 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 645
 BRM-3 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 645
 BRM-4 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 645
 BRM-5 AAACATAATTATTTAGTTTTAGATGTAGAGGATATTCCTAGAATTGTTAGGGAAGCCTTT 645

BSM-1 TATTTAGCGAGATCCGGTAGGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAA 720
 BSM-2 TATTTAGCGAGATCCGGTAGGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAA 720
 BSM-3 TATTTAGCGAGATCCGGTAGGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAA 720
 BSM-4 TATTTAGCGAGATCCGGTAGGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAA 720
 BSM-5 TATTTAGCGAGATCCGGTAGGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAA 720
 BRM-1 TATTTAGCGAGTTCCGGTCGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAG 705
 BRM-2 TATTTAGCGAGTTCCGGTCGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAG 705
 BRM-3 TATTTAGCGAGTTCCGGTCGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAG 705
 BRM-4 TATTTAGCGAGTTCCGGTCGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAG 705
 BRM-5 TATTTAGCGAGTTCCGGTCGCCCGGTCCGGTTTTAATAGATATACCTAAGGATATACAG 705
 ***** ** * ** *****

BSM-1 CAACAATTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATCTAGCTAGG 780
 BSM-2 CAACAATTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATCTAGCTAGG 780
 BSM-3 CAACAATTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATCTAGCTAGG 780
 BSM-4 CAACAATTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATCTAGCTAGG 780
 BSM-5 CAACAATTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATCTAGCTAGG 780
 BRM-1 CAACAGTTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATTTAGCGAGG 765
 BRM-2 CAACAGTTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATTTAGCGAGG 765
 BRM-3 CAACAGTTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATTTAGCGAGG 765
 BRM-4 CAACAGTTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATTTAGCGAGG 765
 BRM-5 CAACAGTTAGTTGTACCGAAATGGGATGAACCGATGCGGTTACCGGGTTATTTAGCGAGG 765
 ***** ** * ** *****

BSM-1 CTACCGAAAACGGAAAGTGACAATAATAGTTTATAGAGCAGATTATTCGGTTGGTGACGGAA 840
 BSM-2 CTACCGAAAACGGAAAGTGACAATAATAGTTTATAGAGCAGATTATTCGGTTGGTGACGGAA 840
 BSM-3 CTACCGAAAACGGAAAGTGACAATAATAGTTTATAGAGCAGATTATTCGGTTGGTGACGGAA 840
 BSM-4 CTACCGAAAACGGAAAGTGACAATAATAGTTTATAGAGCAGATTATTCGGTTGGTGACGGAA 840
 BSM-5 CTACCGAAAACGGAAAGTGACAATAATAGTTTATAGAGCAGATTATTCGGTTGGTGACGGAA 840
 BRM-1 CTACCGAAGACTCAAAACGATGATAATAGTTTATAGAACAGATTATTCGGTTAGTGACGGAA 825
 BRM-2 CTACCGAAGACTCAAAACGATGATAATAGTTTATAGAACAGATTATTCGGTTAGTGACGGAA 825
 BRM-3 CTACCGAAGACTCAAAACGATGATAATAGTTTATAGAACAGATTATTCGGTTAGTGACGGAA 825
 BRM-4 CTACCGAAGACTCAAAACGATGATAATAGTTTATAGAACAGATTATTCGGTTAGTGACGGAA 825
 BRM-5 CTACCGAAGACTCAAAACGATGATAATAGTTTATAGAACAGATTATTCGGTTAGTGACGGAA 825
 ***** ** * ** *****

BSM-1 TCGAAGCGCCCGTTTTGTACGTCGGCGGTGGATGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 900
 BSM-2 TCGAAGCGCCCGTTTTGTACGTCGGCGGTGGATGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 900
 BSM-3 TCGAAGCGCCCGTTTTGTACGTCGGCGGTGGATGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 900
 BSM-4 TCGAAGCGCCCGTTTTGTACGTCGGCGGTGGATGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 900
 BSM-5 TCGAAGCGCCCGTTTTGTACGTCGGCGGTGGATGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 900
 BRM-1 TCGAAGAGGCCCGTTTTGTATGTGGCGGTGGGTGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 885
 BRM-2 TCGAAGAGGCCCGTTTTGTATGTGGCGGTGGGTGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 885
 BRM-3 TCGAAGAGGCCCGTTTTGTATGTGGCGGTGGGTGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 885
 BRM-4 TCGAAGAGGCCCGTTTTGTATGTGGCGGTGGGTGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 885
 BRM-5 TCGAAGAGGCCCGTTTTGTATGTGGCGGTGGGTGTTTGAATTCGAGTGACGAGTTGAAC 885
 ***** * ***** ** ***** *****

 BSM-1 CGGTTTGTGGAGCTTACGGGGATTCCGGTAGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGGGCGTAC 960
 BSM-2 CGGTTTGTGGAGCTTACGGGGATTCCGGTAGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGGGCGTAC 960
 BSM-3 CGGTTTGTGGAGCTTACGGGGATTCCGGTAGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGGGCGTAC 960
 BSM-4 CGGTTTGTGGAGCTTACGGGGATTCCGGTAGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGGGCGTAC 960
 BSM-5 CGGTTTGTGGAGCTTACGGGGATTCCGGTAGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGGGCGTAC 960
 BRM-1 CGGTTTGTGCGAGCTTACGGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTTC 945
 BRM-2 CGGTTTGTGCGAGCTTACGGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTTC 945
 BRM-3 CGGTTTGTGCGAGCTTACGGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTTC 945
 BRM-4 CGGTTTGTGCGAGCTTACGGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTTC 945
 BRM-5 CGGTTTGTGCGAGCTTACGGGGATTCCGGTTGCGAGTACTTTGATGGGGCTTGGAGCGTTC 945
 ***** ***** ***** ***** *

 BSM-1 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1020
 BSM-2 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1020
 BSM-3 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1020
 BSM-4 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1020
 BSM-5 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1020
 BRM-1 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1005
 BRM-2 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1005
 BRM-3 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1005
 BRM-4 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1005
 BRM-5 CCGGCTTCGAGTGATTTGTCGCTTCGGATGCTGGGGATGCACGGGACGGTTTACGCGAAT 1005

 BSM-1 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1080
 BSM-2 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1080
 BSM-3 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1080
 BSM-4 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1080
 BSM-5 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1080
 BRM-1 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1065
 BRM-2 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1065
 BRM-3 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1065
 BRM-4 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1065
 BRM-5 TACGCGGTTGATAAGAGTGATTTGTTGCTTGCGTTTGGGGTACGGTTTATGACCGTGTG 1065

 BSM-1 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCC 1140
 BSM-2 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCC 1140
 BSM-3 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCC 1140
 BSM-4 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCC 1140
 BSM-5 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCC 1140
 BRM-1 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCT 1125
 BRM-2 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCT 1125
 BRM-3 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCT 1125
 BRM-4 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCT 1125
 BRM-5 ACCGGGAAGCTCGAGGCGTTTGCAGCCGCGCGAAGATTGTGCATATTGATATTGATCCT 1125

BSM-1 GCGGAAATCGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGATTGTGGTGATATTAAGGTTGCG 1200
 BSM-2 GCGGAAATCGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGATTGTGGTGATATTAAGGTTGCG 1200
 BSM-3 GCGGAAATCGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGATTGTGGTGATATTAAGGTTGCG 1200
 BSM-4 GCGGAAATCGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGATTGTGGTGATATTAAGGTTGCG 1200
 BSM-5 GCGGAAATCGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGATTGTGGTGATATTAAGGTTGCG 1200
 BRM-1 GCGGAGATTGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGGTTGTGGTGATGTTAAGGTCGCG 1185
 BRM-2 GCGGAGATTGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGGTTGTGGTGATGTTAAGGTCGCG 1185
 BRM-3 GCGGAGATTGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGGTTGTGGTGATGTTAAGGTCGCG 1185
 BRM-4 GCGGAGATTGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGGTTGTGGTGATGTTAAGGTCGCG 1185
 BRM-5 GCGGAGATTGGGAAGAATAAGCAGCCGCATGTGTCGGTTGTGGTGATGTTAAGGTCGCG 1185
 ***** ** *****

BSM-1 TTACAGGGGCTTAATAAAATTTTGGAGCGTAATAATAATAATAATCTTGATTTCGGG 1260
 BSM-2 TTACAGGGGCTTAATAAAATTTTGGAGCGTAATAATAATAATAATCTTGATTTCGGG 1260
 BSM-3 TTACAGGGGCTTAATAAAATTTTGGAGCGTAATAATAATAATAATCTTGATTTCGGG 1260
 BSM-4 TTACAGGGGCTTAATAAAATTTTGGAGCGTAATAATAATAATAATCTTGATTTCGGG 1260
 BSM-5 TTACAGGGGCTTAATAAAATTTTGGAGCGTAATAATAATAATAATCTTGATTTCGGG 1260
 BRM-1 TTACAGGGGCTTAATAAGATTTTGGAGGGTAATAATAAT-----CTTGATTTCGGG 1236
 BRM-2 TTACAGGGGCTTAATAAGATTTTGGAGGGTAATAATAAT-----CTTGATTTCGGG 1236
 BRM-3 TTACAGGGGCTTAATAAGATTTTGGAGGGTAATAATAAT-----CTTGATTTCGGG 1236
 BRM-4 TTACAGGGGCTTAATAAGATTTTGGAGGGTAATAATAAT-----CTTGATTTCGGG 1236
 BRM-5 TTACAGGGGCTTAATAAGATTTTGGAGGGTAATAATAAT-----CTTGATTTCGGG 1236
 ***** *****

BSM-1 AATTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1320
 BSM-2 AATTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1320
 BSM-3 AATTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1320
 BSM-4 AATTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1320
 BSM-5 AATTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1320
 BRM-1 AGTTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1296
 BRM-2 AGTTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1296
 BRM-3 AGTTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1296
 BRM-4 AGTTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1296
 BRM-5 AGTTGGAGGAAGGAGTTGGATGAGCAAAAGGTGAAGTTCCCGTTGAGTTTTAAACGTTT 1296
 * *****

BSM-1 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGACGAGTTAACGGGCGGGAAC 1380
 BSM-2 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGACGAGTTAACGGGCGGGAAC 1380
 BSM-3 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGACGAGTTAACGGGCGGGAAC 1380
 BSM-4 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGACGAGTTAACGGGCGGGAAC 1380
 BSM-5 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGACGAGTTAACGGGCGGGAAC 1380
 BRM-1 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAAC 1356
 BRM-2 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAAC 1356
 BRM-3 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAAC 1356
 BRM-4 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAAC 1356
 BRM-5 GGTGAAGCGATTCCGCCGCAGTATGCGATTTCAGGTTCTTGATGAGTTAACGGGCGGGAAC 1356

BSM-1 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCGGCCAGTTTTATAAATAT 1440
 BSM-2 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCGGCCAGTTTTATAAATAT 1440
 BSM-3 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCGGCCAGTTTTATAAATAT 1440
 BSM-4 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCGGCCAGTTTTATAAATAT 1440
 BSM-5 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCGGCCAGTTTTATAAATAT 1440
 BRM-1 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTATAAGTAT 1416
 BRM-2 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTATAAGTAT 1416
 BRM-3 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTATAAGTAT 1416
 BRM-4 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTATAAGTAT 1416
 BRM-5 GCGATTATTAGTACCGGGGTCGGGCAGCATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTATAAGTAT 1416
 ***** ** *****

BSM-1 AATAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCC 1500
 BSM-2 AATAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCC 1500
 BSM-3 AATAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCC 1500
 BSM-4 AATAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCC 1500
 BSM-5 AATAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCAATGGGTTTCGGGCTGCC 1500
 BRM-1 AACAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCTATGGGTTTCGGGCTGCCT 1476
 BRM-2 AACAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCTATGGGTTTCGGGCTGCCT 1476
 BRM-3 AACAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCTATGGGTTTCGGGCTGCCT 1476
 BRM-4 AACAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCTATGGGTTTCGGGCTGCCT 1476
 BRM-5 AACAAACCGAGACAATGGTTGACTTCGGGTGGGCTCGGGGCTATGGGTTTCGGGCTGCCT 1476
 ** *****

BSM-1 GCGGCTATCGGGCGGCTGTTGCAAGACCGGATGCGGTGGTCGTTGATATCGACGGTGAC 1560
 BSM-2 GCGGCTATCGGGCGGCTGTTGCAAGACCGGATGCGGTGGTCGTTGATATCGACGGTGAC 1560
 BSM-3 GCGGCTATCGGGCGGCTGTTGCAAGACCGGATGCGGTGGTCGTTGATATCGACGGTGAC 1560
 BSM-4 GCGGCTATCGGGCGGCTGTTGCAAGACCGGATGCGGTGGTCGTTGATATCGACGGTGAC 1560
 BSM-5 GCGGCTATCGGGCGGCTGTTGCAAGACCGGATGCGGTGGTCGTTGATATCGACGGTGAC 1560
 BRM-1 GCTGCTATCGGGCGGCCGTTGCGAGACCGGATGCAGTAGTGGTTGATATCGACGGTGAC 1536
 BRM-2 GCTGCTATCGGGCGGCCGTTGCGAGACCGGATGCAGTAGTGGTTGATATCGACGGTGAC 1536
 BRM-3 GCTGCTATCGGGCGGCCGTTGCGAGACCGGATGCAGTAGTGGTTGATATCGACGGTGAC 1536
 BRM-4 GCTGCTATCGGGCGGCCGTTGCGAGACCGGATGCAGTAGTGGTTGATATCGACGGTGAC 1536
 BRM-5 GCTGCTATCGGGCGGCCGTTGCGAGACCGGATGCAGTAGTGGTTGATATCGACGGTGAC 1536
 ** *****

BSM-1 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACTATCCGCGTCGAGAATCTGCCCGTT 1620
 BSM-2 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACTATCCGCGTCGAGAATCTGCCCGTT 1620
 BSM-3 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACTATCCGCGTCGAGAATCTGCCCGTT 1620
 BSM-4 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACTATCCGCGTCGAGAATCTGCCCGTT 1620
 BSM-5 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACTATCCGCGTCGAGAATCTGCCCGTT 1620
 BRM-1 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACGATCCGTGTCGAGAATCTACCCGTT 1596
 BRM-2 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACGATCCGTGTCGAGAATCTACCCGTT 1596
 BRM-3 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACGATCCGTGTCGAGAATCTACCCGTT 1596
 BRM-4 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACGATCCGTGTCGAGAATCTACCCGTT 1596
 BRM-5 GGGAGCTTTATAATGAACGTTCAAGAGTTAGCGACGATCCGTGTCGAGAATCTACCCGTT 1596

BSM-1 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1680
 BSM-2 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1680
 BSM-3 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1680
 BSM-4 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1680
 BSM-5 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1680
 BRM-1 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1656
 BRM-2 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1656
 BRM-3 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1656
 BRM-4 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1656
 BRM-5 AAGATATTATTACTTAATAACCAGCATTTGGGTATGGTGGTTCAATTGGAGGATCGGTTT 1656

BSM-1 TACAAGGCGAACCGGGCGCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACTGAAATATTC 1740
 BSM-2 TACAAGGCGAACCGGGCGCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACTGAAATATTC 1740
 BSM-3 TACAAGGCGAACCGGGCGCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACTGAAATATTC 1740
 BSM-4 TACAAGGCGAACCGGGCGCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACTGAAATATTC 1740
 BSM-5 TACAAGGCGAACCGGGCGCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACTGAAATATTC 1740
 BRM-1 TACAAGGCGAACCGGGCTCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACGGAAATATTC 1716
 BRM-2 TACAAGGCGAACCGGGCTCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACGGAAATATTC 1716
 BRM-3 TACAAGGCGAACCGGGCTCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACGGAAATATTC 1716
 BRM-4 TACAAGGCGAACCGGGCTCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACGGAAATATTC 1716
 BRM-5 TACAAGGCGAACCGGGCTCATACGTATTTAGGTAACCCGTCGAACGAGACGGAAATATTC 1716

BSM-1 CCGAACATGTTGAAGTTTGCTGAAGCGTGTGATATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1800
 BSM-2 CCGAACATGTTGAAGTTTGCTGAAGCGTGTGATATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1800
 BSM-3 CCGAACATGTTGAAGTTTGCTGAAGCGTGTGATATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1800
 BSM-4 CCGAACATGTTGAAGTTTGCTGAAGCGTGTGATATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1800
 BSM-5 CCGAACATGTTGAAGTTTGCTGAAGCGTGTGATATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1800
 BRM-1 CCGAACATGTTGAAGTTTGCGGAAGCGTGTGGTATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1776
 BRM-2 CCGAACATGTTGAAGTTTGCGGAAGCGTGTGGTATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1776
 BRM-3 CCGAACATGTTGAAGTTTGCGGAAGCGTGTGGTATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1776
 BRM-4 CCGAACATGTTGAAGTTTGCGGAAGCGTGTGGTATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1776
 BRM-5 CCGAACATGTTGAAGTTTGCGGAAGCGTGTGGTATCCCGGCTGCGCGTGTGACGCGGAAG 1776

BSM-1 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGAAGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1860
 BSM-2 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGAAGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1860
 BSM-3 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGAAGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1860
 BSM-4 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGAAGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1860
 BSM-5 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGAAGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1860
 BRM-1 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGACGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1836
 BRM-2 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGACGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1836
 BRM-3 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGACGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1836
 BRM-4 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGACGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1836
 BRM-5 GCGGATCTTCGGGCGGCGATT CAGACGATGTTGGATACGCCCCGGGCCGTACCTGTTGGAT 1836

BSM-1 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTGTTGCCGATGATTCCGGCGGGTGGCGGGTTCTCG 1920
 BSM-2 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTGTTGCCGATGATTCCGGCGGGTGGCGGGTTCTCG 1920
 BSM-3 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTGTTGCCGATGATTCCGGCGGGTGGCGGGTTCTCG 1920
 BSM-4 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTGTTGCCGATGATTCCGGCGGGTGGCGGGTTCTCG 1920
 BSM-5 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTGTTGCCGATGATTCCGGCGGGTGGCGGGTTCTCG 1920
 BRM-1 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTTTTGCCGATGATTCCGGCTGGTGGTGGTTTTGCG 1896
 BRM-2 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTTTTGCCGATGATTCCGGCTGGTGGTGGTTTTGCG 1896
 BRM-3 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTTTTGCCGATGATTCCGGCTGGTGGTGGTTTTGCG 1896
 BRM-4 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTTTTGCCGATGATTCCGGCTGGTGGTGGTTTTGCG 1896
 BRM-5 GTTATTGTGCCGCATCAAGAACATGTTTTGCCGATGATTCCGGCTGGTGGTGGTTTTGCG 1896

BSM-1 GATGTGATCACGGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1959
 BSM-2 GATGTGATCACGGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1959
 BSM-3 GATGTGATCACGGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1959
 BSM-4 GATGTGATCACGGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1959
 BSM-5 GATGTGATCACGGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1959
 BRM-1 GATGTGATCACTGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1935
 BRM-2 GATGTGATCACTGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1935
 BRM-3 GATGTGATCACTGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1935
 BRM-4 GATGTGATCACTGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1935
 BRM-5 GATGTGATCACTGAAGGTGACGGCAGAACGAAGTACTGA 1935

Anexo F

Alinhamento das seqüências de aminoácidos, da região codificadora do gene da ALS, em biótipos sensíveis (BSM 1, 2, 3, 4, 5) e resistentes (BRM 1, 2, 3, 4, 5) aos herbicidas inibidores da ALS em *Bidens pilosa*. Regiões sublinhadas correspondem aos domínios conservados da proteína. Regiões sombreadas correspondem ao peptídeo de trânsito e ao domínio de ligação do Mg^{2+} e Tiamina difosfato. Letras W e L em negrito correspondem à alteração do aminoácido Triptofano (W) pelo aminoácido Leucina (L), responsável pela resistência.

Peptídeo de Trânsito

```

BSM-1  MAALTPSNPHITTVPPPSSTTTTLHRETFEPVHPTPPKRRHLVISNVLNSKPTPTTTIT 60
BSM-2  MAALTPSNPHITTVPPPSSTTTTLHRETFEPVHPTPPKRRHLVISNVLNSKPTPTTTIT 60
BSM-3  MAALTPSNPHITTVPPPSSTTTTLHRETFEPVHPTPPKRRHLVISNVLNSKPTPTTTIT 60
BSM-4  MAALTPSNPHITTVPPPSSTTTTLHRETFEPVHPTPPKRRHLVISNVLNSKPTPTTTIT 60
BSM-5  MAALTPSNPHITTVPPPSSTTTTLHRETFEPVHPTPPKRRHLVISNVLNSKPTPTTTIT 60
BRM-1  MAALTPSNPHITTVPPPS-TATLHRETFEPVHPTPPKRRHLAISNVLNSKPTPTTTIT 55
BRM-2  MAALTPSNPHITTVPPPS-TATLHRETFEPVHPTPPKRRHLAISNVLNSKPTPTTTIT 55
BRM-3  MAALTPSNPHITTVPPPS-TATLHRETFEPVHPTPPKRRHLAISNVLNSKPTPTTTIT 55
BRM-4  MAALTPSNPHITTVPPPS-TATLHRETFEPVHPTPPKRRHLAISNVLNSKPTPTTTIT 55
BRM-5  MAALTPSNPHITTVPPPS-TATLHRETFEPVHPTPPKRRHLAISNVLNSKPTPTTTIT 55
***** **.***.*:*****.***** ****

```

Dom. C

```

BSM-1  HPPTATPLPARFAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSHTIRNI 120
BSM-2  HPPTATPLPARFAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSHTIRNI 120
BSM-3  HPPTATPLPARFAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSHTIRNI 120
BSM-4  HPPTATPLPARFAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSHTIRNI 120
BSM-5  HPPTATPLPARFAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSHTIRNI 120
BRM-1  HPVTPTVPAREAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSQTIRNI 115
BRM-2  HPVTPTVPAREAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSQTIRNI 115
BRM-3  HPVTPTVPAREAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSQTIRNI 115
BRM-4  HPVTPTVPAREAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSQTIRNI 115
BRM-5  HPVTPTVPAREAPDQPRKGSVDLVEALEREVTDVFAYPGGASMEIHQALTRSQTIRNI 115
**.***.*:*****.*****

```

Dom. A

BSM-1	LPRHEQGGVFAAEGYARASGLPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	180
BSM-2	LPRHEQGGVFAAEGYARASGLPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	180
BSM-3	LPRHEQGGVFAAEGYARASGLPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	180
BSM-4	LPRHEQGGVFAAEGYARASGLPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	180
BSM-5	LPRHEQGGVFAAEGYARASGLPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	180
BRM-1	LPRHEQGGVFAAEGYARASGKPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	175
BRM-2	LPRHEQGGVFAAEGYARASGKPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	175
BRM-3	LPRHEQGGVFAAEGYARASGKPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	175
BRM-4	LPRHEQGGVFAAEGYARASGKPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	175
BRM-5	LPRHEQGGVFAAEGYARASGKPGVCIATSGPGATNLVSLADALLDSVPMVAITGQVPRR	175

Dom. D

BSM-1	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLARSGRPGLIDIPKDIQ	240
BSM-2	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLARSGRPGLIDIPKDIQ	240
BSM-3	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLARSGRPGLIDIPKDIQ	240
BSM-4	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLARSGRPGLIDIPKDIQ	240
BSM-5	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLARSGRPGLIDIPKDIQ	240
BRM-1	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLASSGRPGLIDIPKDIQ	235
BRM-2	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLASSGRPGLIDIPKDIQ	235
BRM-3	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLASSGRPGLIDIPKDIQ	235
BRM-4	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLASSGRPGLIDIPKDIQ	235
BRM-5	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRIVREAFYLASSGRPGLIDIPKDIQ	235

BSM-1	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTESDNNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	300
BSM-2	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTESDNNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	300
BSM-3	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTESDNNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	300
BSM-4	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTESDNNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	300
BSM-5	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTESDNNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	300
BRM-1	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTQNDNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	295
BRM-2	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTQNDNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	295
BRM-3	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTQNDNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	295
BRM-4	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTQNDNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	295
BRM-5	QQLVVPKWDEPMRLPGYLARLPKTQNDNSLEQIIRLVTESKRPVLYVGGGCLNSSDELN	295

*****:.*:*****

BSM-1	RFVELTGIPVASTLMGLGAYPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	360
BSM-2	RFVELTGIPVASTLMGLGAYPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	360
BSM-3	RFVELTGIPVASTLMGLGAYPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	360
BSM-4	RFVELTGIPVASTLMGLGAYPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	360
BSM-5	RFVELTGIPVASTLMGLGAYPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	360
BRM-1	RFVELTGIPVASTLMGLGAFPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	355
BRM-2	RFVELTGIPVASTLMGLGAFPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	355
BRM-3	RFVELTGIPVASTLMGLGAFPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	355
BRM-4	RFVELTGIPVASTLMGLGAFPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	355
BRM-5	RFVELTGIPVASTLMGLGAFPASSDLSLRMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFD DRV	355

*****:*****

BSM-1	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICGDIKVALQGLNKILERNNNNNNLD FG	420
BSM-2	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICGDIKVALQGLNKILERNNNNNNLD FG	420
BSM-3	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICGDIKVALQGLNKILERNNNNNNLD FG	420
BSM-4	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICGDIKVALQGLNKILERNNNNNNLD FG	420
BSM-5	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSICGDIKVALQGLNKILERNNNNNNLD FG	420
BRM-1	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCGDVKVALQGLNKILE---GNNNLD FG	412
BRM-2	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCGDVKVALQGLNKILE---GNNNLD FG	412
BRM-3	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCGDVKVALQGLNKILE---GNNNLD FG	412
BRM-4	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCGDVKVALQGLNKILE---GNNNLD FG	412
BRM-5	TGKLEAFASRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCGDVKVALQGLNKILE---GNNNLD FG	412

*****:***:*****

BSM-1 NWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 480
 BSM-2 NWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 480
 BSM-3 NWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 480
 BSM-4 NWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 480
 BSM-5 NWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 480
 BRM-1 SWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 472
 BRM-2 SWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 472
 BRM-3 SWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 472
 BRM-4 SWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 472
 BRM-5 SWRKELDEQKVKFPLSFKTTFGEAIPPQYAIQVLDELTTGGNAIISTGVGQHQMWAQAQFYKY 472

BSM-1 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 540
 BSM-2 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 540
 BSM-3 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 540
 BSM-4 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 540
 BSM-5 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 540
 BRM-1 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 532
 BRM-2 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 532
 BRM-3 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 532
 BRM-4 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 532
 BRM-5 NKPRQWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AAVARPDVVVDIDGDSFTIMNVQELATIRVENLPV 532

Dom. B

BSM-1 KILLINN OHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACDIPAARVTRK 600
 BSM-2 KILLINN OHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACDIPAARVTRK 600
 BSM-3 KILLINN OHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACDIPAARVTRK 600
 BSM-4 KILLINN OHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACDIPAARVTRK 600
 BSM-5 KILLINN OHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACDIPAARVTRK 600
 BRM-1 KILLINN OHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACGIPAARVTRK 592
 BRM-2 KILLINN OHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACGIPAARVTRK 592
 BRM-3 KILLINN OHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACGIPAARVTRK 592
 BRM-4 KILLINN OHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACGIPAARVTRK 592
 BRM-5 KILLINN OHLGMVVQLEDRFYKANRAHTYLGNPSTNETEIFPNMLKFAEACGIPAARVTRK 592

Dom. E

BSM-1 ADLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFSDVITEGDGRTKY 652
 BSM-2 ADLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFSDVITEGDGRTKY 652
 BSM-3 ADLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFSDVITEGDGRTKY 652
 BSM-4 ADLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFSDVITEGDGRTKY 652
 BSM-5 ADLRAAIQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFSDVITEGDGRTKY 652
 BRM-1 ADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFADVITEGDGRTKY 644
 BRM-2 ADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFADVITEGDGRTKY 644
 BRM-3 ADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFADVITEGDGRTKY 644
 BRM-4 ADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFADVITEGDGRTKY 644
 BRM-5 ADLRAAIQTMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPAGGGFADVITEGDGRTKY 644

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, M.; TRIFUNOVA, A.; ANDERSSON, A.B.; JOHANSSON, M.; BÜLOW, L.; HOFVANDER, P. A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene. **Plant Cell Report**, v.22, p.261-267, 2003.
- BRANDLE, J.E.; MIKI, B.L. Agronomic performance of sulfonyleurea-resistant transgenic flue-cured tobacco grown under field conditions. **Crop Science**, v.33, p. 847-852, 1993.
- BRASILEIRO, A.C.M. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-Cenargem, 1998. 309p.
- BERNASCONI, P.; WOODWORTH, A.R.; ROSEN, B.A.; SUBRAMANIAN, M.V., SIEHL, D.L. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 29, p. 17381-17385, 1995.
- BETTS, K.J.; EHLKE, N.J.; WYSE, D.L.; GRONWALD, J.W.; SOMERS, D.A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Science**, v.40, p.184,189, 1992.
- BLAST. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. (04 Jan. 2004).

- BOUTSALIS, P.; KAROTAN, J.; POWLES, S.B. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. **Pesticide Science**, v.55, n.5, p. 507-516, 1999.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.
- BURGOS, N.R.; KUK, Y.-I.; TALBERT, R.E. *Amaranthus palmeri* resistance and differential tolerance of *Amaranthus palmeri* and *Amaranthus hybridus* to ALS-inhibitor herbicides. **Pesticide Management Science**, v.57, p.449-457, 2001.
- CHIPMAN, D.; BARAK, Z.; SCHLOSS, J. V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1385, p. 401-419, 1998.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase e acetil coenzima a carboxilase. Piracicaba, 2000. 211p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CLUSTAL W. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. (23 Fev. 2004).
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). <http://www.conab.gov.br>. (01 abr. 2004).
- CULPEPPER, A. C.; YORK, R. B. B.; KATHERINE, M. J. Weed management in glufosinate- and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v.14, p.77-88, 2000.

- DIEBOLD, R.S.; MCNAUGHTON, K.E.; LEE, E.A.; TARDIF, F.J. Multiple resistance to imazethapyr and atrazine in Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, v. 51, n.3, p.312-318, 2003.
- DIGGLE, A.J.; NEVE, P.B.; SMITH, F.P. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance in finite weed populations. **Weed Research**, v.43, p.371-382, 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- DUGGLEBY, R. G.; PANG, S.S. Acetohydroxyacid Synthase. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, n.1, p.1-36, 2000.
- DUGGLEBY, R.G.; PANG, S.S.; YU, H.; GUDDAT, L.W. Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase – Interpretation of herbicide-resistance data. **European Journal of Biochemistry**, v.270, p.2995-2904, 2003.
- EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, n.300, p.1005-1016, 2000.
- FOES, M.J.; LIXIN, L.; TRANEL, P.J.; WAX, L.M.; STOLLER, E.W. A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. **Weed Science**, v.46, n.5, p.514-520, 1998.
- FOES, M.J.; LIU, L.; STOLLER, E.W.; WAX, L.M.; TRANEL, P.J. A kochia (*Kochia scoparia*) biotype resistant to triazine and ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v.47, n.1, p.21-27, 1999.

GERWICK, B.C.; MIRELES, L.C.; EILERS, R.J. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. **Weed Technology**, v.7, p. 519-524, 1993.

GRESSEL, J. Molecular biology of weed control. **Transgenic Research**, v.9, p.355-382, 2000.

GROMBONE-GUARANTINI, M.T.; SOLFERINE, V.N. *Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*: padrões morfológicos e moleculares. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE AÇÃO A RESISTÊNCIA DE PLANTAS AOS HERBICIDAS. <http://www.hrac-br.com.br/trabalhos.htm>. (15 maio 2004).

GRULA, J.W.; HUDSPETH, R.L.; HOBBS, S.L.; ANDERSON, D.M. Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*. **Plant Molecular Biology**, v. 28, n. 5, p. 837-846, 1995.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166, p.557, 1983.

HANSON, B.D.; PARK, K.W.; MALLORY-SMITH, C.A.; THILL, D.C. Resistance of *Camelina microcarpa* to acetolactate synthase inhibiting herbicides. **Weed Research**, v.44, n.3, p.187-194, 2004.

HATCHER, P.E.; MELANDER, B. Combining physical, cultural and biological methods: prospects for integrated non-chemical weed management strategies. **Weed Research**, v.43, p.303-322, 2003.

- HAUGHN, G.H.; SMITH, J.; MAZUR, B.; SOMMERVILLE, C. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonyurea herbicides. **Molecular and General Genetics**, v.211, p.266-271, 1988.
- HEAP, I. M. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. **Pesticide Science**, v.51, p.235-243, 1997.
- HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.
- HOLT, J.S.; LeBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed Technology**, v.4, p.141-149, 1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). <http://www.ibge.gov.br>. (01 abr. 2004).
- INTERNATIONAL SURVEY OF HERBICIDE RESISTANT WEEDS (ISHRW). <http://www.weedscience.org>. (01 Apr 2004).
- KEELER, S.J.; SANDERS, P.; SMITH, J.K.; MAZUR, B.J. Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. **Plant Physiology**, v.102, p.1009-1018, 1993.

- KOVAR, J.L.; ZHANG, J.; FUNKE, R.P.; WEEKS, D.P. Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation. **The Plant Journal**, v. 29, n. 1, p. 109-117, 2002.
- LEE, Y.T.; DUGGLEBY, R.G. Regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. **FEBS Letters**, v.512, p. 180-184, 2002.
- LINDQVIST, Y.; SCHNEIDER, G.; ERMLER, U.; SUNDSTRÖM, M. Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2,5 Å resolution. **EMBO Journal**, v.11, p. 2373-2379, 1992.
- LOVELL, S.T.; WAX, L.M.; SIMPSON, D.M.; McGLAMERY, M. Using the in vivo Acetolactate synthase (ALS) assay for identifying herbicide-resistant weeds. **Weed Technology**, v.10, p. 936-942, 1996.
- MAZZUR, B. J.; FALCO, S. C. The development of herbicide resistant crops. **Plant Physiology and Molecular Biology**, v.40, p.441-470, 1989.
- MEDLIN, C.R.; SHAW, D. R. Economic comparison of broadcast and site-specific herbicide applications in nontransgenic and glyphosate-tolerant *Glycine max*. **Weed Science**, v. 48, p.653-661, 2000.
- MILLER, J.H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972. 1v.

- MONQUEIRO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; CARRER, C. Biology, management and biochemical/genetic characterization of weed biotypes resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Scientia Agrícola**, v.60, n.13, p.495-503; 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v.15, n.2, p. 473-497, 1962.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (02 May 2004).
- OTT, K.H.; KWAGH, J.G., STOCKTON, G.W.; SIDOROV, V.; KAKEFUDA, G. Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Molecular Biology**, v.263, p.359-368, 1996.
- PANG, S.S.; DUGGLEBY, R.G.; GUDDAT, L.W. Crystal structure of yeast acetohyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v.317, p.249-262, 2002a.
- PANG, S.S.; GUDDAT, L.W.; DUGGLEBY, R.G. Crystallization of the FAD-independent acetolactate synthase of *Klasiella pneumoniae*. **Acta Crystallographica**, v.D58, p.1237-1239, 2002b.
- PANG, S.S.; GUDDAT, L.W.; DUGGLEBY, R.G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.9, p.7639-7644, 2003.

- PANG, S.S.; GUDDAT, L.W.; DUGGLEBY, R.G. Crystallization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase in complex with the sulfonylurea herbicide chlorimuron ethyl. **Acta Crystallographica**, v.D60, p.153-155, 2004.
- PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J. Molecular analysis of cloransulam resistance in population of giant ragweed. **Weed Science**, v.50, n.3, p.299-305, 2002.
- PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; ALEXANDER, A.L.; SCHMITZER, P.R. A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. **Weed Science**, v.49, n.4, p.485-490, 2001.
- PONCHIO, J.A.R. Resistência de *Bidens pilosa* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. Piracicaba, 1997. 139p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- POSTON, D.H.; WILSON, H.P.; HINES, T.E. Imidazolinone resistance in several *Amaranthus hybridus* populations. **Weed Science**, v.48, p.508-513, 2000.
- SAMBROK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 545p.
- SCHLOSS, J.V.; CISKANIK, L.M.; VAN DYK, D.E. Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. **Nature**, v.331, p.360-362, 1988.
- SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationship. **Weed Technology**, v.9, p.218-227, 1995.

SIBONY, M.; RUBIN, B. Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). **Planta**, v.216, p.1022-1027, 2003.

SIMPSON, D.M.; STOLLER, E.W.; WAX, L.M. An in vivo acetolactate synthase assay. **Weed Technology**, v.9, p.17-22, 1995.

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). <http://www.sindag.com.br>. (01 abr 2004).

TAN, M.K.; MEDD, R.W. Characterisation of the acetolactate synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance. **Plant Science**, v.163, n.2, p.195-205, 2002.

TARGET P. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>. (02 May, 2004).

TRANSEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v.50, p.700-712, 2002.

TRANSEL, P.J.; WRIGHT, T.R.; HEAP, I.M. ALS mutations from herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.com>. (23 May 2004).

TSE, J.M.T.; SCHLOSS, J.V. The oxygenase activity of acetolactate synthase. **Biochemistry**, v.32, p.10398-10403, 1993.

VARGAS, L.; SILVA, A.A.; BORÉM, A.; REZENDE, S. T.; FERREIRA, F.A.; SEDIYAMA, T. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Viçosa, MG: UFV. 1999. p.131.

- VERVLIET, G.; HOLSTERS, M.; TEUCHY, H.; MONTAGU, M. van; SCHELL, J.
Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages
in *Agrobacterium* strains. . **Journal of General Virology**, v.26, p.33-48,
1975.
- YOON, T.Y.; CHUNG, S.M.; CHANG, S.I.; YOON, M.Y.; HAHN, T.R.; CHOI, J.D.
Roles of lysine 219 and 255 residues in tobacco acetolactate synthase.
Biochemical and Biophysical Research Communications, v.293, p.433-
439, 2002.
- YU, Q.; ZHANG, X.Q.; HASHEN, A.; WALSH, M.J.; POWLES, S.B. ALS gene
proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated
wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science**, v.51,
p.831-838, 2003.