

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A IMAZETHAPYR E  
RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa* spp.)

Everton Danilo Bortoly  
Engenheiro Agrônomo/UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase em Herbologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Agosto de 2013

DEDICO

*Aos meus pais Ramiro e Clarice,  
ao meu irmão Carlos e à minha  
namorada Liliana pelo apoio  
incondicional.*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

*Arthur Schopenhauer*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu mestre Aldo Merotto Jr. pelos conselhos e apoio durante o período em que me orientou no curso de mestrado. Agradeço também pelo tempo dedicado a esse trabalho, pelos ensinamentos passados, e por me fazer pensar, refletir e colocar as ideias no lugar, o que foi indispensável para o cumprimento dessa árdua tarefa que me dispus a enfrentar.

À minha namorada Liliana Martins Techio que me apoiou incondicionalmente, pela compreensão, paciência, dedicação, amor e carinho. Agradeço pela presença todo o tempo, principalmente nos momentos difíceis pelos quais passamos, que nos permitiram evoluir profissionalmente e pessoalmente. E mesmo com todos contratemplos enfrentados, continuamos juntos e mais fortes para encarar novos desafios.

À minha família, meus pais Carlos Ramiro Bortoly e Fátima Clarice Schneider Bortoly e meu irmão Carlos Alberto Bortoly que, mesmo distantes fisicamente, se mantiveram sempre presentes em espírito, me motivando a seguir em frente e não esmorecer diante das dificuldades. Obrigado pelo amor incondicional, pelas palavras de incentivo e pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar. A vocês dedico esse trabalho e meus esforços durante esses anos de mestrado.

Aos professores do Departamento de Plantas de Lavoura, em especial Ribas Antonio Vidal, André Luis Thomas, Carla Andrea Delatorre, Itamar Cristiano Nava e Marcelo

Teixeira Pacheco, pelo auxílio e disponibilidade de sempre. Os conhecimentos transmitidos por vocês contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos parceiros que deram suporte no desenvolvimento das análises referentes à filogenia. À professora Ilsi Iob Boldrini pela assistência nas análises morfológicas e ao doutorando Tiago Luiz da Silva Alves, professora Tatiana Teixeira de Souza Chies e professora Fernanda Bered pelo auxílio nas análises moleculares.

Ao laboratorista Fábio Berndt pela amizade, por estar sempre disposto a auxiliar e transmitir o conhecimento necessário para realização das etapas de laboratório transcorridas neste período.

Aos amigos antigos e àqueles que surgiram durante essa etapa, pelo apoio e pelos conselhos que foram decisivos para eu continuar em frente sempre com determinação e confiança, assim como, pelo convívio, conversas, confraternizações e risadas que me fizeram descontraír em momentos de tensão.

Aos bolsistas do IRGA e aos bolsistas de iniciação científica que cooperaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários Maria Alice Weber, Karina Silveira Pieretti, Marisa Carvalho Bello, Adroaldo Volthaire De Paula e Fábio Martins Berndt, por todo apoio, tanto em questões burocráticas quanto em questões pessoais, pela amizade e pelo aporte técnico.

Aos pesquisadores Valmir Menezes, Augusto Kalsing e demais colaboradores do Instituto Rio Grandense do Arroz pela parceria durante este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo aporte financeiro durante este curso.

À Deus pela vida, por ter colocado em meu caminho tantas oportunidades e ter dado o discernimento necessário para que eu fizesse as melhores escolhas, me possibilitando alcançar mais um dos objetivos que tracei para a minha realização pessoal e profissional.

# AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A IMAZETHAPYR E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa* spp.)<sup>1</sup>

Autor: Everton Danilo Bortoly

Orientador: Aldo Merotto Jr.

## RESUMO

O capim-arroz (*Echinochloa* spp.) é considerado uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz irrigado devido aos elevados prejuízos na produtividade desta cultura. A identificação das diversas espécies de capim-arroz é dificultada devido à grande variabilidade existente nos descritores taxonômicos utilizados. Recentemente diversas populações de capim-arroz têm apresentado resistência aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) e o mecanismo responsável pela resistência não é completamente conhecido. Os objetivos desta dissertação foi identificar a ocorrência do local de ação alterado como mecanismo de resistência aos herbicidas e avaliar a classificação taxonômica e as relações filogenéticas em acessos de capim-arroz de forma a orientar o correto manejo desta espécie na cultura do arroz irrigado. A avaliação do mecanismo de resistência aos herbicidas foi realizada através de experimentos de crescimento de plantas e atividade da enzima ALS em avaliações de curva dose-resposta e do sequenciamento do gene ALS em seis biótipos. Os resultados demonstraram a ocorrência de menor sensibilidade da enzima ALS nos biótipos PALMS01 e MOSTS51 que apresentam GR<sub>50</sub> de 140 e 700 g.ha<sup>-1</sup> de imazethapyr devido à ocorrência das mutações S<sub>653</sub>N e W<sub>574</sub>L, respectivamente. A identificação de espécie e a relação filogenética foram realizadas através da classificação morfológica com base em chaves taxonômicas e de marcadores moleculares de cloroplasto referentes ao íntron *trnT* e *trnL* e de espaçadores transcritos internos (ITS) em 29 acessos originários de lavouras de arroz irrigado do RS. A avaliação morfológica apresentou grande variabilidade tanto de características vegetativas como reprodutivas dificultando a utilização das chaves taxonômicas para vários acessos. O comprimento do eixo secundário da ráquis menor que 2 cm foi característico da espécie *E. colonun* e a largura do antécio inferior a 1,2 mm foi discriminador de *E. crus-pavonis* em relação à *E. crus-galli*. A análise filogenética através de sequências de cpDNA foi mais discriminadora em relação aos parâmetros morfológicos do que as sequências ITS. A espécie *E. colonun* apresentou vários indel e mutações possibilitando a fácil diferenciação das demais espécies. A sequência de nucleotídeos de cpDNA indicou a ocorrência de duas mutações diferenciais entre as espécies *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* referentes às alterações de Timina para Guanina e Adenina para Timina, respectivamente. Existe grande variabilidade morfológica entre as espécies de capim-arroz ocorrentes no RS e marcadores moleculares de cpDNA são eficientes para a discriminação destas espécies. A resistência aos herbicidas imidazolinonas em capim-arroz está relacionada à ocorrência de mutações no gene ALS.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (106 p) Agosto, 2013.

# EVALUATION OF THE MECHANISM OF RESISTANCE IMAZETHAPYR AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF BARNYARDGRASS (*Echinochloa* spp.)<sup>2</sup>

Author: Everton Danilo Bortoly

Adviser: Aldo Merotto Jr.

## ABSTRACT

The *Echinochloa* complex is considered a major weed of irrigated rice due to high losses in grain yield. The identification of the *Echinochloa* species is difficult due to the large variability of the plant descriptors used in the taxonomic keys. Recently several populations of *Echinochloa* has evolved resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors and the mechanism of resistance is not fully understood. The aim of this study was to identify the occurrence of altered target as a mechanism of herbicide resistance and to evaluate the taxonomic classification and phylogenetic relationships in *Echinochloa* accessions in order to guide the correct management of this species in irrigated rice. The evaluation of the mechanism of herbicide resistance was performed in plant growth and ALS enzyme activity assays evaluated with dose-response curve and by the sequencing of the ALS gene in six *Echinochloa* biotypes. The results demonstrated the occurrence of ALS enzyme insensitivity and the mutations Ser653N and W574L in the ALS gene in two resistant biotypes. The identification and phylogenetic relationship was evaluated through morphological classification based on taxonomic keys and with molecular markers for the chloroplast trnT and trnL intron and internal transcribed spacers (ITS) in 29 accessions collected in irrigated rice fields in RS. Both vegetative and reproductive characteristics were highly variable resulting in difficulties for using the taxonomic keys. The length of the axis of rachis minor that 2 mm was characteristic of the species *E. colonum*, and antherium width of less than 1.2 mm was discriminator *E. crus-pavonis* towards *E. crus-galli*. Phylogenetic analysis using cpDNA sequences was more discriminatory in relation to morphological and ITS sequences. *E. colonum* showed several indel and mutations enabling easy differentiation from other species. The nucleotide sequence of cpDNA obtained with cpDNA markers indicated the occurrence of two differential mutations between species *E. crus-galli* and *E. crus-pavonis* related to the changes of Thymine to Guanine and Adenine to Thymine, respectively. There was large variability among the *Echinochloa* complex accessions collected in RS and molecular markers of cpDNA are efficient to discriminate these species. The resistance to imidazolinone herbicides on barnyardgrass is related to the occurrence of mutations in the ALS gene.

---

<sup>2</sup> Master of science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (106 p) August, 2013.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1 A cultura do arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) .....	6
2.2 Capim-arroz ( <i>Echinochloa</i> spp.) .....	7
2.3 Identificação das espécies de capim-arroz .....	9
2.3.1 Análise filogenética através de marcadores moleculares.....	13
2.4 Resistência das plantas daninhas aos herbicidas .....	15
2.4.1 Mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas.....	16
2.5 Resistência de capim-arroz ( <i>Echinochloa</i> spp.) aos herbicidas .....	18
2.5.1 Ocorrência da resistência em <i>Echinochloa</i> spp.....	19
2.6 Capim-arroz resistente aos herbicidas inibidores da ALS.....	21
2.6.1 Resistência aos herbicidas inibidores da ALS devido à alteração no local de ação .....	23
2.6.2 Atividade da enzima ALS e sequenciamento do gene ALS como indicador de resistência devido a local de ação alterado. ....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1 Análise filogenética de <i>Echinochloa</i> spp. ....	28
3.1.1 Análise morfológica.....	29
3.1.2 Análise molecular .....	33
3.1.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	34
3.1.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA.....	35
3.1.3 Análise dos dados .....	36
3.2 Determinação do mecanismo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr .....	37
3.2.1 Material Vegetal.....	37
3.2.2 Avaliação do efeito do herbicida imazethapyr em experimentos de curva de dose-resposta.....	39
3.2.3 Atividade da enzima ALS em capim-arroz.....	41
3.2.4 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz.....	44
3.2.4.1 Desenho dos <i>primers</i> .....	44
3.2.4.2 Extração de DNA e amplificação do gene ALS .....	46
3.2.4.3 Purificação e análise das regiões amplificadas do gene ALS .....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Análise filogenética de <i>Echinochloa</i> spp. ....	49



	Página
4.1.1 Avaliação de características morfológicas .....	49
4.1.2 Avaliação da variabilidade genética em acessos de capim-arroz .....	58
4.1.2.1 Análise filogenética com base nas sequências de cpDNA e ITS .....	61
4.2 Determinação do mecanismo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr .....	66
4.2.1 Curva dose-resposta para determinação do nível de resistência ao herbicida imazethapyr .....	67
4.2.2 Avaliação do efeito do herbicida imazethapyr na atividade da enzima ALS em diferentes populações de capim-arroz .....	73
4.2.3 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz .....	76
5 CONCLUSÕES .....	83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
7 APÊNDICES.....	95
8 VITA.....	106

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Acessos de capim-arroz utilizados nas avaliações filogenéticas com sua respectiva origem. Porto Alegre, RS. 2013.....	29
2. Características morfológicas avaliadas nas plantas de capim-arroz e a respectiva chave taxonômica relacionada à característica. Porto Alegre, RS. 2013 .....	31
3. Sequência nucleotídica e características dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de DNA do cloroplasto e nuclear. Porto Alegre, RS. 2013.....	35
4. Origem dos biótipos utilizados para determinação do mecanismo de resistência, padrão de resistência aos herbicidas inibidores da ALS e quinclorac e resposta a inibidores de metabolização. Porto Alegre, RS. 2013 .....	38
5. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para obtenção da sequência do gene ALS em capim-arroz e a respectiva região de domínio. Porto Alegre, RS. 2013 .....	45
6. Características morfológicas referentes à fase vegetativa e reprodutiva dos acessos avaliados neste estudo. Porto Alegre, RS. 2013 .....	53
7. Características morfológicas referentes à fase reprodutiva dos acessos, agrupamento segundo dendograma das sequências do cpDNA (Figura 12) e sua classificação com base nas chaves taxonômicas de Kissmann (1991) e Pignatti (1965). Porto Alegre, RS. 2013.....	56
8. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual, aos 7, 14, 21 e 23 DAA e massa seca da parte aérea de seis biótipos de capim-arroz, aos 23 DAA, submetido a diferentes doses do herbicida imazethapyr. Porto Alegre, RS. 2013.....	69
9. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para atividade da enzima ALS de seis biótipos de capim-arroz, submetidos a diferentes doses do herbicida imazethapyr. Porto Alegre, RS. 2013 .....	74

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Ilustração da análise morfológica de estruturas vegetativas das plantas de capim-arroz: Altura total de planta (A); Comprimento da bainha e avaliação da cor (B); Coloração da folha, figura com as bordas roxas (C); Comprimento da folha (D); Detalhe do colarinho da folha, ponto inicial da medição (E); Largura da folha (F). Porto Alegre, RS. 2013..... 32
2. Ilustração da análise morfológica de estruturas reprodutivas das plantas de capim-arroz: Comprimento do pedúnculo (A); Comprimento da panícula (B); Eixo secundário, terceiro de baixo para cima, coletado para posterior análise (C); Comprimento e largura do eixo secundário (D); Comprimento e largura da espiguetta e comprimento da arista (E); Comprimento e largura da gluma inferior (F) e Comprimento e largura do antécio (G). Porto Alegre, RS. 2013. .... 33
3. Ilustração hipotética do intron *trn* pertencente ao DNA do cloroplasto. Porto Alegre, RS. 2013..... 34
4. Aparato utilizado para filtração a vácuo. (a) Kitazato de 500 mL, (b) funil com rolha para vedação, (c) disco de Teflon perfurado, (d) suporte da solução e (e) presilha de prancheta adaptada. A montagem é realizada com b dentro de a, c dentro de b, d em cima de b e por fim a presilha fixando os componente b, c e d. Porto Alegre, RS. 2013. ..43
5. Representação esquemática do gene ALS com suas regiões de domínio (C, A, D, F, B e E) e os respectivos *primers* utilizados na amplificação. Porto Alegre, RS. 2013. .... 45
6. Foto da lígula da espécie *E. polystachia*. (Valmir G. Menezes, IRGA)..... 50
7. Foto do racemo das espécies *E. crus-galli* (a) e *E. crus-pavonis* (b), obtidas com auxílio de uma lupa com 40X de aumento. Porto Alegre, RS. 2013. .... 57
8. Figura representativa do alinhamento de sequências o cpDNA evidenciando região em tandem para as espécies *E. oryzicola* e *E. phyllopogon*, apresentando duas repetições 13 pb. Porto Alegre, RS. 2013. .... 59
9. Figura representativa do alinhamento de sequências do cpDNA evidenciando região em tandem para as espécies *E. oryzicola* e *E. phyllopogon*. Substituição de nucleotídeo e indel diferente para cada espécie. Porto Alegre, RS. 2013..... 60

Página

10. Figura representativa do alinhamento de sequências do cpDNA evidenciando região que sofreu indel, e em outra região apresenta alterações nucleotídicas. Porto Alegre, RS. 2013..... 61
11. Figura representativa do alinhamento, detalhe da sequência do cpDNA evidenciando região que sofreu indel, e em outra região apresenta mutações, podendo diferenciar *E. crus-galli* de *E. crus-pavonis*. Porto Alegre, RS. 2013..... 61
12. Dendograma realizado com acessos de *Echinochloa* originados de lavouras do RS (classificação original com base na análise morfológica e descritos com a denominação “BR” após o nome). Sequências de cpDNA de diversas espécies do gênero *Echinochloa* foram utilizadas como critério de agrupamento. Porto Alegre, RS. 2013..... 63
13. Dendograma realizado com acessos de *Echinochloa* originados de lavouras do RS (classificação original com base na análise morfológica e descritos com a denominação “BR” após o nome). Sequências de ITS de diversas espécies do gênero *Echinochloa* foram utilizadas como critério de agrupamento. Porto Alegre, RS. 2013..... 65
14. Controle visual (%) de seis biótipos de capim-arroz em função de diferentes concentrações do herbicida imazethapyr, aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 23 DAA (D). As equações correspondentes encontram-se na Tabela 8. Porto Alegre, RS. 2013. .... 68
15. Massa seca da parte aérea (%) de seis biótipos de capim-arroz, em relação à testemunha não tratada, em função de diferentes doses do herbicida imazethapyr, aos 23 DAA. Equações correspondentes encontram-se na Tabela 8. Porto Alegre, RS. 2013..... 71
16. Redução da absorvância (%) de seis biótipos de capim-arroz, em relação à testemunha não tratada, em função de diferentes doses do herbicida imazethapyr. Equações correspondentes encontram-se na Tabela 9. Porto Alegre, RS. 2013..... 75
17. Produto representativo da amplificação de todos os biótipos para os domínios AD (b), região entre domínio D e F (c), domínio F (d) e os domínios BE (e) do gene ALS de capim-arroz, separados em gel de agarose 2%, e corados com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb (a). Porto Alegre, RS. 2012. .... 77
18. Cromatograma do sequenciamento da região B do biótipo suscetível (SUSP01) figura (a) e do biótipo resistente MOSTS51 figura (b). Porto Alegre, RS. 2013..... 79
19. Cromatograma do sequenciamento da região E do biótipo suscetível (SUSSP01) figura (a) e do biótipo resistente PALMS01 figura (b). Porto Alegre, RS. 2013..... 81

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais cereais que compõe a alimentação brasileira e mundial. Para suprir a crescente demanda de alimentos existe a necessidade de aumentar a produção desse cereal, o que pode ser alcançado com melhorias do manejo da cultura, principalmente no controle das plantas daninhas. O controle insatisfatório das plantas daninhas reduz em média a produtividade em até 35% (Oerke & Dehne, 2004) e a ausência do controle pode diminuir a produtividade do arroz em 90% (Andres & Machado, 2004).

Diversas plantas daninhas ocorrem na cultura do arroz irrigado, sendo que o capim-arroz (*Echinochloa* spp.) é considerado um dos principais grupos de espécies devido ao alto efeito de competição com a cultura. De forma geral, infestações de 40 plantas m<sup>-2</sup> de *Echinochloa* spp. reduzem o rendimento dos grãos de 50 a 70% (Carey, 1990; Fischer *et al.*, 1997) e apenas uma planta de capim-arroz reduz o rendimento de grãos entre 8,4 e 11,3% (Agostinetto *et al.*, 2007). Com mais especificidade, infestação de 40 plantas m<sup>-2</sup> da espécie *E. colona* Link (L.) reduz a produtividade de 27 a 62% (Fischer *et al.*, 1997). Da mesma forma, a espécie *E. crus-galli* (L.) Beauv. na densidade de 2 plantas m<sup>-2</sup> reduz 10% da produtividade da cultura (Carey, 1990).

A denominação de capim-arroz é utilizada para várias espécies do gênero *Echinochloa* e, atualmente, a diferenciação filogenética dessas espécies é importante, dentre outros fatores, para a identificação e controle principalmente das plantas que

apresentam resistência aos herbicidas. Morfologicamente há várias características que permitem distinguir as espécies de capim-arroz, como por exemplo, presença ou não de aristas, altura de planta, tamanho das panículas, entre outras. A correta identificação das espécies de capim-arroz é dificultada pela possível existência de híbridos que apresentam características intermediárias entre as espécies e também pela existência de plantas *mimics* que pertencem a uma espécie, porém, apresentam características semelhantes de outra. Uma alternativa para aumentar eficiência na classificação é o uso de marcadores moleculares, os quais possibilitam analisar as possíveis variações ocorridas no DNA presente no cloroplasto (Tabacchi *et al.*, 2006). Estas informações podem ser utilizadas para a correta identificação das espécies *Echinochloa* ocorrentes no Sul do Brasil, e assim racionalizar a aplicação dos métodos de controle e o monitoramento da ocorrência de resistência aos herbicidas.

O controle de capim-arroz é realizado na maioria das lavouras através do uso de herbicidas. Atualmente na cultura do arroz são utilizadas cultivares de arroz resistentes aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas (Clearfiled®). Essas cultivares proporcionam a utilização de herbicidas imidazolinonas que possuem elevada eficiência no controle das principais plantas daninhas desta cultura, o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) e o capim-arroz. Desde o ano agrícola 2009/2010 essas cultivares são utilizadas em torno de 50% das áreas de arroz irrigado no estado do Rio Grande do Sul (RS), que corresponde a aproximadamente 500 mil hectares. Nesta situação, os herbicidas imidazolinonas vêm sendo utilizados de forma contínua e sem respeitar a rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação.

O uso irracional desses herbicidas, juntamente com os problemas de manejo da cultura do arroz, contribuiu para a evolução da resistência de capim-arroz aos herbicidas

imidazolinonas e demais produtos inibidores da acetolactato sintase (ALS). O capim-arroz com resistência aos herbicidas é atualmente um problema para a obtenção de altos rendimentos na cultura do arroz e demanda conhecimentos sobre os processos relacionados à resistência para a determinação correta dos procedimentos de prevenção e controle.

O mecanismo de resistência das plantas daninhas aos herbicidas pode ser devido a processos relacionados ou não à alteração do local de ação. O local de ação alterado resulta em uma redução da afinidade da enzima pelo herbicida e geralmente aumenta a insensibilidade a outros herbicidas do mesmo grupo químico e mecanismo de ação. Essa alteração ocorre devido a uma mutação que na maioria das vezes, é decorrente de uma substituição dos aminoácidos e que pode ocorrer em um ou em vários locais do gene alvo (Shaner, 1999). Algumas dessas alterações são mais comuns e podem proporcionar resistência aos herbicidas de certo grupo químico, porém suscetibilidade aos demais. Este mecanismo é responsável pela maior frequência dos casos relatados de resistência aos herbicidas. A resistência não relacionada ao local de ação está associada com o aumento da metabolização que ocorre pela ação das enzimas citocromo monooxigenase (CytP450) e Glutathione S-Transferase (GSTs) que detoxificam as moléculas do herbicida. A resistência causada por incremento da metabolização geralmente ocorre também aos herbicidas de diferentes mecanismos de ação e até mesmo a produtos ainda não utilizados na área onde as plantas foram selecionadas (Powles & Yu, 2010).

Populações de capim-arroz das principais regiões produtoras de arroz irrigado do RS e Santa Catarina (SC) têm apresentado resistência aos herbicidas do grupo das imidazolinonas (Merotto *et al.*, 2009; Mariot *et al.*, 2010). Do mesmo modo, populações de capim-arroz resistente ao herbicida quinclorac também foram identificadas em trabalhos realizados nas regiões orizícolas dos estados do RS e SC (Menezes & Ramírez, 2000;

Merotto *et al.*, 2000; Andres *et al.*, 2007; Mariot *et al.*, 2010). Outros trabalhos recentes comprovam que biótipos oriundos das regiões produtoras de arroz irrigado de SC apresentam resistência múltipla ao quinclorac e aos herbicidas inibidores da enzima ALS (Noldin *et al.*, 2009). Alguns biótipos de capim-arroz resistente ao imazethapyr possuem resposta aos inibidores de metabolização indicando a participação desse processo como mecanismo de resistência aos herbicidas (Matzenbacher, 2012). Porém, alguns biótipos resistentes não apresentam incremento de metabolização indicando a possibilidade de ocorrência de outros mecanismos de resistência de forma conjunta ou isolada.

### **Objetivo geral**

Identificar a ocorrência de local de ação alterado como mecanismo de resistência aos herbicidas e avaliar a classificação taxonômica e relações filogenéticas em populações de capim-arroz resistentes aos herbicidas.

### **Objetivos específicos**

(i) Realizar a identificação taxonômica de acessos de capim-arroz originados do estado do RS com base nas principais chaves de identificação de espécies do gênero *Echinochloa*.

(ii) Realizar a análise filogenética com base em marcadores do cloroplasto e ITS em acessos de capim-arroz originados do estado do RS e correlacionar com as principais chaves de identificação de espécies do gênero *Echinochloa*.



(iii) Determinar a ocorrência de local de ação alterado como mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS em populações de capim-arroz originados do estado do RS.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais cereais que compõe a alimentação brasileira e mundial. Este cereal é um dos alimentos mais produzidos e consumidos no mundo, sendo cultivado em mais de 110 países e tornando-o um importante alimento contra a fome (FAO, 2009). O arroz é uma excelente fonte de energia devido à alta concentração de amido, proteínas, vitaminas e minerais, além de apresentar outras vantagens como o baixo teor de lipídios.

A produção mundial de arroz em 2012 foi de aproximadamente 728,7 milhões de toneladas, sendo 0,7% maior do que em 2011 que já tinha sido considerada recorde. Houve também aumento na área cultivada, que ultrapassou 162 milhões de hectares (FAO, 2013). O Brasil é o nono produtor mundial de arroz e o maior fora do continente asiático. Na safra 2012/13, o Brasil cultivou uma área de 2.420 milhões de hectares, 0,3% menor do que na safra 2011/12, porém com produção de 12.062 milhões de toneladas, 463 mil toneladas a mais do que na safra 2011/2012 (CONAB, 2013). Esse aumento se deve, exclusivamente, ao desempenho das lavouras do Rio Grande do Sul (RS), que além do aumento da área de 1,3%, chegando a 1,066 milhões de hectares, aumentando também a produtividade média atingiu 7.525 kg.ha<sup>-1</sup>. O estado do RS é o maior produtor de arroz do Brasil, representando

aproximadamente 65% da produção nacional, ou seja, 8.026 milhões de toneladas (CONAB, 2013).

Nos últimos anos houve um grande aumento da produtividade da cultura de arroz irrigado no Brasil, devido principalmente ao desenvolvimento de tecnologias e estratégias de manejo. Dentre essas tecnologias destacam-se o controle de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) que proporcionou semeadura na época recomendada e manejos adequados de fertilidade e irrigação. Entretanto, muitos fatores contribuem para a redução dos rendimentos de grãos na cultura do arroz irrigado. A competição com plantas daninhas é um fator que limita a expressão do potencial genético e causa redução na produtividade das lavouras. Os prejuízos de um controle insatisfatório das plantas daninhas na cultura do arroz irrigado podem chegar a 40% (Oerke, 2006), enquanto que a ausência de controle pode ocasionar perdas de até 85% (Fleck *et al.*, 2004). No Brasil, o arroz vermelho e o capim-arroz (*Echinochloa* spp.) são os principais responsáveis pela redução de produtividade das lavouras de arroz.

## **2.2 Capim-arroz (*Echinochloa* spp.)**

O capim-arroz (*Echinochloa* spp.) é considerado a sexta planta daninha mais importante do mundo (Heap, 2011). Na cultura do arroz, esta planta daninha é a mais severa no Arkansas (EUA) (Norsworthy *et al.*, 2007) e uma das mais problemáticas nas lavouras de arroz irrigado do Sul do Brasil. Essa importância se deve, principalmente, porque o capim-arroz apresenta capacidade de rápida adaptação aos mais diversos ambientes, ampla distribuição, rápida e alta capacidade de germinação, e algumas espécies germinam sob déficit hídrico ou em solo inundado (Andres & Machado, 2004). Outra particularidade dessa planta daninha é que sua fase vegetativa é semelhante a da planta de

arroz (Agostinetto & Vargas, 2009; Yamasue, 2001). Esta planta daninha também apresenta excelente plasticidade com relação à temperatura de germinação, variando entre 25 e 30°C, mas pode germinar com temperaturas inferiores a 10°C (Guillemín *et al.*, 2012). Devido a todas essas características, o capim-arroz é considerado um problema em lavouras de arroz irrigado em mais de 60 países (Barrett & Wilson, 1983).

O capim-arroz é uma planta autógama e apresenta uma produção média de 40 mil sementes por planta, mas em alguns casos essa quantidade pode ultrapassar 1.000.000 de sementes (Holm *et al.*, 1977; Maun & Barnett, 1986; Norris, 2003). Uma área com cinco anos de monocultivo de arroz foi possível contabilizar 2.500 plântulas.m<sup>-2</sup> de capim-arroz (Melo *et al.*, 2004). Para agravar mais essa problemática não há informações precisas sobre o nível de ploidia de cada espécie, o que há disponíveis é que a espécie *E. crus-galli* é alohexaplóide e a espécie *E. oryzicola* é tetraploide (Yabuno, 1966) porém, de forma geral o capim-arroz é uma planta poliplóide (Osuna *et al.*, 2011) e apresenta uma extensa reorganização do genoma com genes multiplicados que podem sofrer uma divergência imediata de função, ou até mesmo uma nova função (Otto, 2003).

O conjunto de características relacionadas à persistência e competição fazem com que o capim-arroz seja considerado uma “super planta daninha”, onde apenas uma planta de capim-arroz por metro quadrado pode reduzir o rendimento de grãos de arroz entre 5 e 22%, variando conforme a cultivar semeada e a época do início da irrigação (Galon *et al.*, 2007). Em outro trabalho foi encontrado que a presença de uma planta por metro quadrado reduz o rendimento de grãos da cultura do arroz entre 8,4 e 11,3%, quando o início da irrigação foi de 1 e 20 dias após o tratamento com herbicida, respectivamente (Agostinetto *et al.*, 2007). De forma geral, infestações de 40 plantas m<sup>-2</sup> de *Echinochloa* ssp. reduzem o rendimento dos grãos de 50 a 70% (Carey, 1990; Fischer *et al.*, 1997) e essa redução no

rendimento pode ser variável dependendo da espécie infestante. No caso do *E. colona* Link (L.), infestação com 40 plantas.m<sup>-2</sup> reduz o rendimento de 27 a 62% (Fischer *et al.*, 1997). Já, *E. crus-galli* na densidade de 2 plantas.m<sup>-2</sup> resulta em redução de 10% da produtividade, e em infestações de 40 plantas m<sup>-2</sup> a redução é de 50 a 70% (Carey, 1990; Fischer *et al.*, 1997; Mennan *et al.*, 2012).

### 2.3 Identificação das espécies de capim-arroz

O gênero *Echinochloa* é cosmopolita e apresenta cerca de 50 espécies, incluindo diversas subespécies e variedades. No Brasil, há principalmente a incidência das espécies *E. colona* (L.) Link., algumas variedades de *E. crus-galli* (L.) Beauv., sendo *E. crus-galli* var. *crus-galli* (L.) Beauv., *E. crus-galli* var. *mitis* (Pursh) Peterm., *E. helodes* (Hackel) Parodi., *E. crus-pavoris* (Kunth) Hitchc e *E. polystachya* (Kunth) Hitchc. (Moreira & Bragança, 2010). Essas espécies são encontradas em canais de irrigação, áreas alagadas, lavouras de arroz irrigado e eventualmente em outras culturas. Com relação à espécie *E. crus-pavonis* há vários trabalhos relacionando essa espécie como variedade da espécie *E. crus-galli* e sendo denominada neste trabalho de *E. crus-galli* var. *crus-pavonis* (Pfitscher & Barreto, 1976; Kissmann, 1991). No presente trabalho será utilizada a denominação *E. crus-pavonis* como espécie de acordo com Pirola (1965) e Yamaguchi *et al.* (2008) e não na forma de variedade *E. crus-galli* var. *crus-pavonis* como apresentado em Kissmann (1991).

As espécies do gênero *Echinochloa* apresentam características morfológicas específicas que atualmente são empregadas para sua distinção. Por exemplo, a espécie *E. colona* é facilmente identificada pela sua panícula compacta em relação às demais espécies do gênero e suas espiguetas são inseridas alternadamente, opostas e verticiladas em um

mesmo eixo. Da mesma forma, *E. helodes* se diferencia das demais espécies por ter uma panícula comprimida, longa e desprovida de ramificações laterais. A espécie *E. polystachya* é a única espécie que apresenta lígula. Essas características possibilitam a diferenciação destas espécies através de descritores morfológicos de fácil identificação. Porém, a espécie *E. crus-galli* não apresenta características discriminatórias de fácil identificação. As características utilizadas na identificação das espécies de *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* estão relacionadas com a inflorescência onde, a *E. crus-galli* apresenta panículas mais curtas, normalmente eretas e com coloração verde ou com tons púrpuros e em comparação com *E. crus-pavonis* que possui as panículas maiores, com aristas longas, geralmente pendentes e com coloração rósea ou um púrpura pálido (Moreira & Bragança, 2010; Kissmann, 1991; EMBRAPA, 2011). Mesmo com todas essas características, há um elevado grau de incerteza com relação à variabilidade de plantas ocorrentes em lavouras de arroz irrigado do RS devido principalmente à ocorrência de plantas com características mistas e intermediárias em relação às descritas anteriormente.

Várias chaves taxonômicas de identificação das espécies do gênero *Echinochloa* são descritas na literatura (Pfitscher & Barreto, 1976; Carretero, 1981; Kissmann, 1991; Pignatti, 1982; Pirola, 1965). Essas chaves taxonômicas são usadas como base para vários trabalhos em diferentes partes do mundo. Trabalho realizado na Itália utilizou as chaves taxonômicas de Carretero e Pignatti como referência (Tabacchi *et al.*, 2006). As chaves taxonômicas de Kissmann (1991) e de Pfitscher & Barreto (1976) foram elaboradas objetivando a identificação de capim-arroz da Região Sul do Brasil. Os principais descritores destas chaves são a presença ou ausência de lígula e de arista, comprimento total da planta, da folha bandeira, da espiguetta, da gluma inferior, relação do comprimento da gluma inferior pelo da espiguetta, número de nervuras na gluma inferior e comprimento

da panícula e dos racemos. Há algumas características que são empregadas apenas como informação complementar para a identificação, como por exemplo, a cor arroxeadada da borda das folhas e das espiguetas. Esta característica não é um elemento de identificação porque é passível de ocorrência em todas as espécies, porém há elevado percentual de ocorrência em *E. crus-galli* e *E. colonum* (Sparacino *et al.*, 1994).

Outro trabalho realizado na Itália utilizou como referência as chaves taxonômicas de Pignatti (1982) e Carretero (1981). As características levadas em consideração segundo a chave taxonômica de Pignatti foram a presença de pelo na região do colarinho, comprimento de espiguetas (L), comprimento da gluma inferior (G) e pelos na panícula. A chave taxonômica de Carretero (1981) baseia-se no comprimento da gluma inferior (G), a razão do comprimento da gluma inferior pelo comprimento da espiguetas e presença de aristas. Nesse trabalho também foram analisadas outras características que apresentam relevância para classificação do capim-arroz como a altura de planta, coloração da seção basal do caule, da região do colarinho, da margem da lâmina foliar, da nervura central e das espiguetas, hábito de inflorescência e a largura da espiguetas. As variáveis cor do caule e comprimento das espiguetas explicam 30% da variabilidade total (Tabacchi *et al.*, 2006).

Estudo realizado na Itália apontou que somente 44% das plantas de capim-arroz encontradas em lavouras de arroz irrigado foram passíveis de classificação através da chave taxonômica de Pignatti (1982) (Sparacino *et al.*, 1994). Os 56% não classificados mostraram uma gama de características fenotípicas intermediárias, por decorrência da ampla variabilidade e presença de biótipos resultantes de hibridização (Sparacino *et al.*, 1994). Esse problema pode ser devido ao efeito ambiental, hibridização entre espécies ou até mesmo populações diferentes que se assemelham e dificultam a correta identificação dessas espécies (Tabacchi *et al.*, 2006). A identificação errada pode levar a consequências

indesejáveis em relação ao manejo das plantas daninhas. Por exemplo, caruru (*Amaranthus powellii* S. Wats.) e caruru-roxo (*Amaranthus hybridus* L.) foram classificados como caruru-gigante (*Amaranthus retroflexus* L.) e isso causou confusão com relação à descrição e identificação da resistência destas espécies à atrazina (Warwick & Weaver, 1980). Assim, a identificação correta é uma questão importante para o desenvolvimento de manejo de plantas daninhas.

A identificação das espécies de capim-arroz através de chaves taxonômicas é dificultada devido elevada semelhança morfológica existente entre as espécies (Aoki & Yamaguchi, 2008). Outro agravante é a possível existência de híbridos, que apresentam características intermediárias entre as espécies, e pela existência de plantas *mimics*, que pertencem a uma espécie, porém, apresentam características semelhantes de outra e até mesmo se assemelhando a cultura do arroz (Utano *et al.*, 2009). Outra característica importante que as plantas de capim-arroz apresentam é a alta variabilidade que é afetada pela heterogeneidade ambiental bem como as práticas agrícolas. Trabalho avaliando biótipos de capim-arroz da Malásia e da Indonésia confirmou que quando cultivados em ambiente controlado os biótipos da Malásia apresentaram maior velocidade de emergência e maior estatura do que em seu habitat natural, já o biótipo da Indonésia não sofreu essa variação no crescimento (Tasrif *et al.*, 2004). Neste estudo é enfatizada a necessidade da utilização de marcadores moleculares para auxiliar a identificação das espécies devido ao elevado grau de variabilidade genética entre as espécies do gênero *Echinochloa*.

As técnicas de biologia molecular têm desempenhado uma função cada vez mais importante nas diversas áreas da ciência. As técnicas moleculares têm aberto novas possibilidades para estudos taxonômicos em muitas espécies que não são distintas morfológicamente, como por exemplo, capim-arroz (Taberlet *et al.*, 1991). Uma dessas



técnicas é o uso de marcadores moleculares universais que possibilitam analisar as variações ocorridas no DNA e, através disto, estabelecer associações entre indivíduos (Tabacchi *et al.*, 2006).

### **2.3.1 Análise filogenética através de marcadores moleculares**

Marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramenta para auxiliar na classificação taxonômica de espécies vegetais. Marcadores moleculares universais correspondem a sequências nucleotídicas iniciadoras (*primers*) desenhados com base no DNA do cloroplasto (cpDNA) que é altamente conservado em praticamente todo o reino vegetal. Isso é possível porque, diferente do DNA nuclear que é herdado de ambos os genitores materno e paterno, o cpDNA possui herança materna, podendo assim identificar a qual espécie a planta pertence e também se o mesmo é resultado de hibridização entre espécies (Buso, 2005). Ainda, os genes que codificam as proteínas do cloroplasto evoluem a uma taxa de 0,2 a  $1 \times 10^{-9}$ , que é cinco vezes mais lenta do que a dos genes nucleares (Clegg & Zurawski, 1992).

Considerando que as espécies vegetais evoluíram a partir de um ancestral comum, as espécies mais próximas, teoricamente, são mais parecidas do que as mais distantes. Assim, a filogenia trabalha com a identificação e entendimento das relações entre as espécies, podendo esclarecer as diferenças entre as mesmas. A sistemática dessa técnica parte da identificação das características similares das espécies analisadas através da análise de genes ou fragmentos de DNA para posterior construção das árvores filogenéticas que representam relações evolucionárias ou o agrupamento dos indivíduos mais parecidos (Buso, 2005). Essa técnica apresenta diversas vantagens quando comparada com a análise morfológica. Dentre essas vantagens, as principais são a possibilidade de executar a análise

em estágios primordiais de desenvolvimento da planta e principalmente por avaliar o DNA excluindo as influências ambientais (Buso, 2005).

No início dos anos 2000, vários estudos relacionados à análise filogenética através do uso de marcadores moleculares universais desenhados com a finalidade de amplificar as regiões intergênicas do cloroplasto. Há diversos *primers* para amplificar as regiões do cpDNA, e os mais utilizados são os que amplificam as regiões não codificadoras. Dentre essas regiões, as mais amplificadas são as regiões entre trnT(UGU) – trnL(UAA), trnL(UAA), trnL(UAA) – trnF(GAA) e o íntron trnL (Pirie *et al.*, 2007). Diversos trabalhos filogenéticos utilizam os *primers* universais para amplificar essas regiões não codificadoras do cpDNA (Yamaguchi *et al.*, 2005; Mennan & Altop, 2012). Esses *primers* foram fundamentais para confirmar que *Raphanus sativus* é um híbrido entre *Brassica nigra* e linhagens de *B. rapa* X *B. oleracea*, sendo *B. oleracea* o progenitor maternal (Yang *et al.*, 2002).

Os marcadores universais amplificam regiões não codificadoras e essas apresentam maior frequência de mutações, podendo ser usado para discriminação molecular por sequenciamento direto dos produtos amplificados, ou por análise de RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) (Yamaguchi *et al.*, 2005). Da mesma forma, outro trabalho usando os mesmos *primers* possibilitou a diferenciação das espécies de capim-arroz, usando técnica de AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado). Trabalho recente que utilizou essa técnica conseguiu diferenciar espécies de capim-arroz, onde na análise constou diferença de 50pb entre *E. crus-galli* e *E. phyllopogon* (Mennan & Altop, 2012). A região do cpDNA é amplamente empregada em estudos filogenéticos (Haider, 2011; Mennan & Altop, 2012; Taberlet *et al.*, 1991; Yamaguchi *et al.*, 2005; Yasuda *et al.*, 2002) porque apresenta uma elevada distribuição

dispersa de RNAs de transferência (*trns*) que apresentam elevado grau de conservação. Há a possibilidade desses marcadores moleculares do cloroplastos não serem suficientes para produzir variável filogenias bem resolvidos e confiáveis. Uma forma de complementar as análises é a utilização de primers que amplifiquem regiões do DNA ribossomal nuclear (Aoki & Yamaguchi, 2008; Kita & Ito, 2000), principalmente os espaçadores de transcrito interno (ITS). Os ITS formam uma parte do genoma nuclear que contém cópias múltiplas de regiões de codificação dos genes nrDNA que estão dispostos em várias matrizes em tandem (Appels e Honeycutt 1986). A região ITS tem sido comumente usado para esclarecer relações entre gêneros bem como entre espécies (Baldwin et al, 1995).

Os marcadores moleculares vêm ganhando espaço na filogenia, e principalmente para classificar espécies de *Echinochloa*. O uso desses *primers* apresenta correlação de 70% entre as análises morfológicas e os marcadores moleculares, podendo classificar facilmente a espécie *E crus-galli* das demais (Tabacchi *et al.*, 2006), confirmando o potencial uso dessa ferramenta para classificação de plantas de capim-arroz. A classificação das espécies de capim-arroz deve ser baseada no sequenciamento de DNA, porque os resultados do sequenciamento são mais precisos que os obtidos nas avaliações morfológicas (Altop & Mennan, 2011).

#### **2.4 Resistência das plantas daninhas aos herbicidas**

Em todo o mundo existem 217 espécies (129 dicotiledôneas e 88 monocotiledôneas) de plantas daninhas resistente aos herbicidas (Heap, 2013). De forma geral, as plantas daninhas são resistentes a 21 dos 25 mecanismos de ação dos herbicidas conhecidos e a 148 diferentes herbicidas, distribuídas em 65 culturas em 61 países (Heap, 2013). As plantas daninhas são denominadas resistentes aos herbicidas quando apresentam

capacidade natural e herdável de sobreviver e completar o seu ciclo de vida após exposição a dose de herbicida que é letal aos indivíduos suscetíveis da mesma espécie (López-Ovejero *et al.*, 2006). Resistência aos herbicidas não é desenvolvida e tão pouco um fator de adaptação das plantas, sendo apenas um simples resultado da pressão de seleção em indivíduos pré-existentes na população (Gressel, 2002).

Com relação ao padrão de resistência, essa pode ser cruzada ou múltipla. A resistência cruzada ocorre quando a planta daninha é resistente a diferentes herbicidas pertencentes ao mesmo mecanismo de ação. A resistência múltipla, por sua vez, envolve herbicidas não relacionados quimicamente entre si e que apresentam mecanismos de ação diferenciados (Christoffoleti & López-Ovejero, 2003). A ocorrência de resistência múltipla aos herbicidas é importante porque elimina a possibilidade de utilização de dois ou mais herbicidas de diferentes mecanismos de ação, reduzindo as alternativas de controle dessa planta daninha.

#### **2.4.1 Mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas**

Os mecanismos de resistência das plantas daninhas aos herbicidas são relacionados ou não ao local de ação do herbicida (Yuan *et al.*, 2007). No primeiro caso, a resistência pode ocorrer pela alteração do local de ação ou pela super expressão da enzima alvo. A alteração do local de ação resulta em redução da afinidade da enzima pelo herbicida, resultando na diminuição da fitotoxicidade do composto, o que torna a planta menos sensível ao produto. Isso ocorre devido à uma mutação na sequência nucleotídica do DNA, que confere uma mudança dos aminoácidos da enzima alvo impedindo ou diminuindo a eficiência da inibição causada pelo herbicida. Esse mecanismo de resistência será melhor detalhado no item 2.8. A superexpressão da enzima alvo resulta do incremento do número

de cópias do gene, do incremento de sua amplificação gênica ou alteração da região regulatória do promotor do gene. Esse mecanismo de resistência é bem elucidado no trabalho com *Amaranthus palmeri* S. Wats., onde foi identificado aumento de cinco a 160 vezes o número de cópias do gene EPSPs, resultando na resistência ao herbicida glyphosate (Gaines, *et al.*, 2010).

A resistência não relacionada ao local de ação pode ocorrer devido a alteração da absorção e/ou da translocação, aumento da metabolização e compartimentalização do herbicida. Dentre esses processos, o mecanismo de resistência devido a processos metabólicos apresenta uma particular relevância porque as enzimas que atuam nesse processo podem, simultaneamente, metabolizar herbicidas de diferentes modos de ação, conferindo resistência múltipla. Outra particularidade desse mecanismo de resistência é que esses processos metabólicos podem detoxificar herbicidas nunca usados e até mesmo moléculas de herbicidas ainda não existentes. A detoxificação dos herbicidas ocorre principalmente pela ação das enzimas citocromo P450 monooxigenase (cyt P450s) e das enzimas glutationa-S-transferases (GSTs) (Powles & Yu, 2010).

A resistência não relacionada a local de ação alterado tem sido encontrada em várias espécies de plantas daninhas, porém com maior frequência em *Lolium multiflorum* L., *Alopecurus myosuroides* e *Echinochloa* spp.. O capim-arroz é uma planta daninha com grande capacidade de metabolizar herbicidas. Há relatos de resistência de capim-arroz por metabolização a bispyribac-sodium (Yun *et al.*, 2005), bensulfuron-methyl (Osuna *et al.*, 2002), fenoxaprop-P-ethyl (Yun *et al.*, 2005), cyhalofop-butyl (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006), thiobencarb (Yun *et al.*, 2005), penoxsulam (Yasuor *et al.*, 2009), propanil (Carey *et al.*, 1997; Leah *et al.*, 1997; Hoagland *et al.*, 2004) e clomazone (Yasuor *et al.*, 2010). A grande capacidade de metabolizar herbicidas pelo capim-arroz e a identificação de

metabolização de imidazolinonas em outras espécies evidencia a possibilidade do envolvimento das enzimas do grupo cyt P450s como mecanismo que torna biótipos de capim-arroz resistentes no Sul do Brasil.

## 2.5 Resistência de capim-arroz (*Echinochloa spp.*) aos herbicidas

Existem vários registros de capim-arroz resistente aos principais herbicidas utilizados no manejo das lavouras de arroz irrigado como, por exemplo, aos herbicidas inibidores da EPSPs, do fotossistema II, da síntese de parede celular, do crescimento da parte aérea, da ALS, de ACCase e da síntese de caroteno (Yasour *et al.*, 2008; Heap, 2013). Seis espécies de capim-arroz apresentam resistência a algum herbicida, sendo *E. colona* (L.) Link., *E. crus-galli* var. *crus-galli* (L.) Beauv, *E. crus-galli* var. *crus-pavonis* (H.B.K) Schult., *E. erecta* (Pollacci) Pign., *E. oryzoides* (Ard.) Fritsch e *E. phyllopogon* (Stapf) Koss (Heap, 2013). Dessas, as espécies *E. crus-galli* var. *crus-pavonis* e *E. erecta* apresentam um caso de resistência, onde *E. crus-galli* var. *crus-pavonis* é resistente ao quinclorac, diagnosticado em 1999 no Brasil e a espécie *E. erecta* apresenta resistência múltipla a propanil e a quinclorac, confirmada em 2004 em biótipo oriundo da Itália (Heap, 2011; Vidotto *et al.*, 2007). As demais espécies apresentam resistência a diversos herbicidas e possuem ocorrência em praticamente todas as regiões produtoras de arroz. As espécies *E. phyllopogon* e *E. colona* apresentam casos de resistência múltipla a três mecanismos de ação diferentes (Heap, 2013).

Trabalhos recentes indicam que, em alguns casos, a origem da resistência é devido ao local de ação alterado em *E. crus-galli* e *E. oryzicola* (Kaloumenos *et al.*, 2013; Heap, 2013; Panozzo *et al.*, 2013; Riar *et al.*, 2013). Salienta-se que quando desenvolvimento do presente estudo as informações, descritas acima, sobre a ocorrência de local de ação

alterado como mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS em *E. crus-galli* e *E. oryzicola* não eram conhecidas. A espécie *E. phyllopogon* apresenta muitos biótipos com resistência múltipla e o mecanismo de resistência é atribuído a processos de metabolização dos herbicidas. Biótipos de *E. phyllopogon* que apresentam resistência múltipla quando tratados com bispyribac-sodium, fenoxaprop-ethyl ou thiobencarb apresentam maior atividade de cyt P450s quando comparados com biótipos suscetíveis (Fischer *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2005). As plantas resistentes desses biótipos quando tratadas com clomazone acumulam de 6 a 12 vezes mais os metabólitos oriundos da detoxificação desse herbicida, enquanto que as plantas suscetíveis acumulam 2,5 vezes mais os mesmos metabólitos (Yasuor *et al.*, 2008). Essa mesma espécie de capim-arroz também apresenta biótipos resistentes ao herbicida cyalofop-butil, que 12 a 24 horas após aplicação do herbicida apresentaram absorção de apenas 30% do herbicida. Os biótipos suscetíveis tiveram 50% de absorção, porém ambos não diferiram na quantidade ou taxas de cyalofop-butil translocado (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006).

### **2.5.1 Ocorrência da resistência em *Echinochloa* spp.**

A espécie *E. colona* apresenta inúmeros casos de resistência aos herbicidas, apresentando casos com resistência múltipla aos herbicidas de três modos de ação diferente. O primeiro caso de resistência nesta espécie foi ao herbicida propanil, no ano de 1987, na Costa Rica, seguido pela Colômbia e outros países da América Central (Heap, 2013). Os biótipos oriundos da Colômbia foram de 3-6 vezes mais resistentes ao herbicida propanil do que os biótipos suscetíveis (Fisher *et al.*, 1993). Porém, a maior problemática dessa espécie teve origem na Austrália em 2007, onde foram feitos os primeiros registros de resistência ao herbicida glifosato, reduzindo cada vez mais o número de herbicidas que

poderiam ser utilizados para controlar essa espécie (Gaines *et al.*, 2012). De todos os casos de resistências relacionadas a essa espécie, apenas se conhece o mecanismo de resistência ao propanil, que está relacionado ao incremento da atividade específica da enzima arylamidase (Leah *et al.*, 1994).

A resistência de *E. crus-galli* aos herbicidas ocorre em vários locais do mundo. O primeiro caso relatado foi em 1978, nos Estados Unidos, onde foi confirmada resistência a propanil e logo em seguida, registrado em vários outros países (Heap, 2013). Nos anos de 1991 e 1992 foram realizados experimentos que comprovaram que biótipos de capim-arroz oriundos do Arkansas, EUA, foram resistentes a propanil (Baltazar & Smith, 1994). Essa resistência foi confirmada em mais 16 municípios do mesmo estado (Carey *et al.*, 1995; Norsworthy *et al.*, 2007). Além desses locais, há também resistência na Grécia (Giannopolitis & Vassiliou, 1989), Colômbia (Fischer *et al.*, 1993), no Sri Lanka (Marambe & Samita, 2002) e, em 2005, nas Filipinas foi registrado o último caso de *E. crus-galli* resistente a propanil. Porém, grandes produtores de arroz como Brasil, China e Coreia do Sul ainda não apresentam nenhum caso de biótipos de capim-arroz resistentes ao herbicida propanil (Heap, 2013).

O primeiro caso registrado de capim-arroz resistente ao herbicida quinclorac ocorreu em 1992, no Sul da Espanha (Lopez-Martinez *et al.*, 1997). Em 1998, este problema surgiu nos Estados Unidos, no ano seguinte no Brasil e em 2000 na China. No primeiro caso, também foi registrado o primeiro biótipo de *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. com resistência múltipla a atrazine e quinclorac. Neste trabalho foi analisado um biótipo resistente ao quinclorac (R) e o outro com resistência múltipla (X). O biótipo R foi suscetível a atrazine e o biótipo X mostrou resistência de 82 vezes maior que o biótipo suscetível. Quando aspergidos com quinclorac, os biótipos X e R foram, respectivamente,



10 e 26 vezes mais resistentes em comparação com biótipo suscetível. Porém ambos os biótipos foram suscetíveis a propanil e molinate (Lopez-Martinez *et al.*, 1997).

No Brasil também existem registros de biótipos de *E. crus-galli* resistentes a quinclorac. O primeiro caso ocorreu em biótipos oriundos de lavouras do estado de SC no ano de 1999 e no ano seguinte foram registrados biótipos com resistência ao mesmo herbicida no estado do RS (Menezes *et al.*, 2001; Heap, 2013). Esses biótipos sobreviveram a aplicações de 1500 g.ha<sup>-1</sup> de quinclorac, enquanto que os biótipos suscetíveis, que nunca tiveram contato com esse herbicida, foram controlados com doses de 188 g.ha<sup>-1</sup> (Menezes *et al.*, 2001).

## 2.6 Capim-arroz resistente aos herbicidas inibidores da ALS

A enzima acetolactato sintase (ALS), também conhecida como acetohidroxiacetato sintase (AHAS), é a primeira enzima da rota de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada que produz os aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Os herbicidas que atuam inibindo a ação dessa enzima pertencem aos grupos químicos imidazolinonas (IMIs), sulfoniluréias (SUs), triazolopyrimidinas (TPs), pirimidinil thiobenzoatos (PTBs) e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (SCTs) (Vidal & Merotto Jr., 2001; Tranel & Wright, 2002). Existem no mundo 131 espécies de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (Heap, 2013). A seleção de plantas resistentes aos herbicidas deste mecanismo de ação é relativamente rápida, surgindo em torno de quatro anos de utilização sucessiva do agente de seleção, tornando a classe de herbicidas com o maior número de espécies resistentes no mundo (Powles & Yu, 2010).

As espécies do gênero *Echinochloa* que apresentam resistência aos herbicidas inibidores da ALS são *E. crus-galli*, *E. oryzoides*, *E. phyllopogon* e *E. colona* (Heap,

2013). No Brasil, biótipos de *E. crus-galli*, coletados no município de Palmares do Sul em 2009, foram 40 vezes mais resistentes ao herbicida imazethapyr, em comparação aos biótipos suscetíveis (Merotto Jr. *et al.*, 2009). Além de serem resistentes a esse herbicida, estes biótipos também apresentaram resistência aos herbicidas dos outros quatro grupos de herbicidas inibidores da ALS, confirmando a ocorrência da resistência cruzada. Estes biótipos também apresentaram controle satisfatório com herbicidas de outros mecanismos de ação (Merotto Jr. *et al.*, 2009). De forma similar, biótipos de *E. colona* oriundos de lavouras do município de Uruguaiana apresentaram resistência cruzada aos herbicidas imazethapyr+imazapic e bispyribac-sodium (Ulguim *et al.*, 2010). Ainda, plantas de capim-arroz não controladas por herbicidas imidazolinonas em lavouras comerciais de arroz irrigado na safra 2008/09 foram identificadas como resistentes aos herbicidas imazethapyr+imazapic, penoxsulan e bispyribac-sodium (Mariot *et al.*, 2010).

O incremento de metabolização é um dos mecanismos de resistência que torna as plantas de capim-arroz resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (Yun *et al.*, 2005; Osuna *et al.*, 2002). A enzima CytP450 é uma das principais enzimas que detoxificam a molécula de herbicida (Powles & Yu, 2010). Capim-arroz resistente aos herbicidas inibidores da ALS é amplamente ocorrente em todas as principais regiões produtoras de arroz do mundo. Experimentos utilizando inibidores de metabolização de herbicidas, como Malathion, comprovam que houve incremento no controle do capim-arroz, indicando a degradação do herbicida por enzimas CytP450 pode ser considerado como mecanismo parcial de resistência aos herbicidas inibidores da ALS (Riar *et al.*, 2012a). De forma semelhante, trabalho realizado por Matzenbacher (2012) com populações de capim-arroz do Sul do Brasil confirmou que das seis populações analisadas, cinco apresentaram resistência ao herbicida imazethapyr. Dessas cinco populações, duas responderam a

aplicação prévia de malathion em aplicação foliar e três populações em aplicação em solução hidropônica, indicando que os processos metabólicos contribuem de forma direta como mecanismo de resistência de capim-arroz resistente aos herbicidas inibidores da ALS. Contudo, as demais populações que foram confirmadas como resistentes e não responderam aos processos metabólicos, sugerem a ocorrência de outro mecanismo de resistência nesta espécie. Desta forma, existe a necessidade de avaliação da ocorrência de mutações no gene ALS, como mecanismo de resistência aos herbicidas, nestas populações que não indicaram ocorrência de incremento de metabolização como mecanismo de resistência. Recentemente, local de ação alterado ocasionado por uma mutação no gene ALS foi associado à resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da ALS em população de capim-arroz do estado de Arkansas, EUA (Riar *et al.*, 2013), Itália (Panozzo *et al.*, 2013) e Grécia (Kaloumenos *et al.*, 2013).

### **2.6.1 Resistência aos herbicidas inibidores da ALS devido à alteração no local de ação**

O mecanismo de resistência aos herbicidas devido à alteração no local de ação está relacionado à superexpressão da enzima alvo do herbicida ou à ocorrência de alterações no gene que codifica essa enzima. Essa alteração, na maioria das vezes, é decorrente de mutações resultantes em substituição de um aminoácido importante para a ligação do herbicida e raramente ocorrem inserções ou deleções do gene ALS (Shaner, 1999). As mutações que conferem resistência aos inibidores de ALS são observadas em regiões conservadas do gene ALS, denominadas de domínios A, B, C, D, E e F (Panozzo *et al.*, 2013). As substituições podem ser encontradas em diversas posições denominadas com base na sequência do gene ALS de *Arabidopsis*: 121, 122, 124, 196, 197, 199, 205, 206,

256, 351, 352, 376, 377, 570, 571, 574, 578, 653 e 654 (Duggleby *et al.*, 2000; Tranel & Wright, 2002; Michael *et al.*, 2006; Powles & Yu, 2010). Entretanto, apenas oito destas mutações, alanina 122 (Ala<sub>122</sub>), prolina 197 (Pro<sub>197</sub>), alanina 205 (Ala<sub>205</sub>), asparagina 376 (Asp<sub>376</sub>), arginine 377 (Arg<sub>377</sub>), triptofano 574 (Trp<sub>574</sub>), serina 653 (Ser<sub>653</sub>) e glycine 654 (Gly<sub>654</sub>) foram confirmadas como mutações que resultam na resistência aos inibidores da ALS em biótipos de plantas daninhas em situações naturais de cultivo a campo (Tranel & Wright, 2002; Whaley *et al.*, 2007; Heap, 2011).

As mutações ocorrentes no gene ALS causam diferentes padrões de resistência aos herbicidas. Substituições nos aminoácidos Ala<sub>122</sub>, Ala<sub>205</sub> e Ser<sub>653</sub> conferem principalmente alto nível de resistência aos herbicidas pertencentes ao grupo das IMIs (Tranel & Wright, 2002) e alguns casos apresentam resistência cruzada a dois ou mais grupos químicos. Contudo, há casos onde o indivíduo é resistente a um determinado grupo e apresenta suscetibilidade a outro. As mutações na Pro<sub>197</sub> apresentam o maior número de espécies resistentes, e também conferem um alto nível de resistência aos herbicidas do grupo das SUs, mas pouca ou nenhuma resistência cruzada aos herbicidas pertencente ao grupo químico das IMIs (Devine & Eberlein, 1997). Porém, há casos que apresentam resistência cruzada principalmente aos herbicidas do grupo das TPs. De forma análoga, a mutação da Asp<sub>376</sub> apresenta elevada resistência ao grupo SUs e TPs onde as espécies *Amaranthus hybridus* e *A. powellii* apresentam elevado nível de resistência cruzada a todos os grupos químicos pertencentes aos herbicidas inibidores da ALS (Ashigh *et al.*, 2009; Coty *et al.*, 2007; Heap, 2013). Alterações decorrentes em apenas um aminoácido são relatadas para *Apera spica-venti* na Agr<sub>377</sub> que apresenta elevado nível de resistência cruzada aos SCTs, SUs e TPs (Massa *et al.*, 2011) e *Setaria viridis* na Gly<sub>654</sub> com elevado nível de resistência a IMIs, baixo a SCTs e SUs e suscetível a PTBs (Laplante *et al.*, 2009). O último

aminoácido que proporciona resistência às plantas daninhas é o Trp<sub>574</sub>, sendo considerado o pior local de mutação, pois todas as espécies que sofreram mutação neste aminoácido apresentam elevado nível de resistência a pelo menos um grupo químico e frequentemente há casos de resistência cruzada a pelo menos dois grupos, podendo haver casos de até quatro grupos (Heap, 2013).

A evolução da resistência de capim-arroz compromete o manejo das lavouras, porque o problema causado pela resistência está relacionado a redução das opções de herbicidas para o controle das plantas daninhas e eventualmente a um aumento do custo de produção. Trabalho realizado nas Filipinas indica que o impacto econômico da presença de capim-arroz resistente é de U\$ 100,00 por hectare (Beltran *et al.*, 2012). Esse aumento do custo de produção pode ser minimizado pela identificação precoce da resistência e informações sobre o mecanismo de resistência. Uma das formas de prevenção e controle de plantas daninhas resistentes aos herbicidas devido ao local de ação alterado é a rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação. Porém, a rotação de herbicidas pode ser inapropriada para as plantas daninhas que apresentam resistência devido a mecanismos não relacionados ao local de ação alterado, como por exemplo, metabolização. O processo de metabolização gera uma problemática maior porque esse mecanismo de resistência, normalmente, resulta em resistência múltipla, necessitando medidas complexas de manejo (Siminsky, 2006). As técnicas de sequenciamento de DNA e atividade enzimática proporcionam resultados precisos para comprovar o mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS (Corbett & Tardif, 2006).

### **2.6.2 Atividade da enzima ALS e sequenciamento do gene ALS como indicador de resistência devido a local de ação alterado.**

Ensaio de atividade enzimática são amplamente realizados com a finalidade de comprovar a resistência aos herbicidas (Gerwich *et al.*, 1993; Lamego *et al.*, 2009; Uchino *et al.*, 2007). Bioensaios *in vitro* extraíndo a enzima ALS dos biótipos resistentes e suscetíveis de *Monochoria vaginalis* confirmaram que os biótipos resistentes foram respectivamente 200 e 30 vezes menos sensível aos herbicidas imazosulfuron e pyrazosulfuron-ethyl, quando comparados com o biótipo suscetível (Kuk *et al.*, 2003). Outro trabalho também utilizando método *in vitro* confirmou que a mutação no aminoácido Ala<sub>122</sub> em *Raphanus raphanistrum* L. confere resistência cruzada a todos os herbicidas inibidores da ALS e que o nível de resistência a SUs e TPs foi maior que os IMIs (Han *et al.*, 2012). Bioensaio *in vitro* como o desenvolvido por Ray (1984), avalia de forma indireta a atividade da ALS, pois a enzima é extraída diretamente da planta e então se mede a atividade pelo acúmulo de acetolactato resultando na formação de acetoína. Os ensaios *in vitro* são complexos, a enzima é instável e apresenta rápida degradação (Corbett & Tardif, 2006).

A avaliação do ensaio *in vivo* da atividade da enzima ALS é realizada de forma similar aos ensaios *in vitro*, porém no método *in vivo* não ocorre à extração da enzima, sendo a aplicação do herbicida e do inibidor da enzima cetoácido-reducto isomerase (KARI), realizada diretamente na planta. Após, essas aplicações é efetuada a análise para quantificação do acúmulo de acetoína produzido pela enzima ALS. O protocolo enzimático *in vivo* mais utilizado foi desenvolvido por Gerwich *et al.* (1993) e modificado diversas vezes conforme a espécie daninha em questão (Lamego *et al.*, 2009; Uchino *et al.*, 2007). O procedimento consiste na utilização do ácido-ciclopropanodicarboxílico (CPCA) que

inibe a enzima KARI. Essa enzima catalisa a reação seguinte da enzima ALS na rota metabólica de síntese de aminoácidos. Na ausência do CPCA, a enzima KARI não é inativada e possibilita a síntese dos aminoácidos. Em plantas suscetíveis, quando se aplica o CPCA juntamente com o herbicida, não é observado acúmulo de acetolactato porque ocorre a inibição da enzima ALS. Nas plantas em que a resistência é originada por mutação na enzima alvo não ocorrerá à inibição da enzima pelo herbicida e, conseqüentemente, ocorrerá um acúmulo de acetolactato, pois a enzima KARI está inibida pela ação do CPCA. O acetolactato acumulado é convertido em acetoína através de método colorimétrico modificado e, posteriormente, é analisada a absorvância em espectrofotômetro.

O sequenciamento do gene ALS também pode ser realizado como forma de identificação direta da ocorrência de local de ação alterado como mecanismo de resistência a herbicida em plantas daninhas. O gene ALS em *Arabidopsis thaliana* apresenta um tamanho de 2365 pares de bases (pb) (Sathasivan *et al.*, 1990). Esse mesmo gene em arroz tem tamanho de 2233pb (Rajguru *et al.*, 2005) enquanto que em *E. crus-galli*, o sequenciamento deste gene apresentou tamanho de 1870pb (Panozzo *et al.*, 2013). A realização do sequenciamento de DNA indica o local de ocorrência e o aminoácido alterado relacionado à resistência aos herbicidas. Atualmente existe grande facilidade de realização do sequenciamento gênico, o que facilita a identificação da ocorrência de local de ação alterado como mecanismo de resistência em plantas daninhas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados os seguintes estudos: i) identificação das relações filogenéticas em acessos de capim-arroz resistentes aos herbicidas com liberação pra uso no Estado do RS; e ii) determinação do mecanismo de resistência em biótipos de capim-arroz resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, que não apresentaram indicativo de incremento na metabolização de herbicidas do grupo químico das imidazolinonas. Estes trabalhos foram realizados no Laboratório da Flora Ruderal (LaFlor), no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS e na Estação Experimental do Instituto Riograndense do Arroz (EEA-IRGA) em 2011 e 2012.

#### 3.1 Análise filogenética de *Echinochloa* spp.

Este estudo foi realizado com base em dois experimentos realizados no período de novembro de 2011 à março de 2012. O primeiro consistiu na análise morfológica de diversas populações de capim-arroz. O segundo experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS e consistiu em analisar as sequências do DNA do cloroplasto dos acessos que apresentaram morfologia contrastante identificados no primeiro estudo.



### 3.1.1 Análise morfológica

O material avaliado consistiu de 29 acessos de capim-arroz, coletados em lavouras orizícolas do Estado do RS e uma população dos Estados Unidos (Tabela 1). Para esse experimento as sementes sofreram procedimento para superação da dormência que consistiu na incubação das sementes em solução de 0,2% de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) com injeção de ar por 4 dias. Após a germinação, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos de 500 mL furados e preenchidos com solo conduzidos até o final do seu ciclo de vida. A adubação foi realizada com 500 kg.ha<sup>-1</sup> de N-P-K na fórmula 5-20-20, incorporada ao solo anterior ao transplante. O crescimento das plantas foi realizado em tanques de concreto desenvolvidos especialmente para o cultivo de arroz irrigado com dimensões de 1,20 x 1,10 x 0,80 m, onde uma lâmina de água de aproximadamente cinco centímetros acima dos copos plásticos foi mantida constantemente com o uso de boias.

TABELA 1. Acessos de capim-arroz utilizados nas avaliações filogenéticas com sua respectiva origem. Porto Alegre, RS. 2013

<b>Acesso</b>	<b>Origem</b>
<i>E. phyllopogon</i> _EUA	Estados Unidos
106, 110, 111, 144	Arroio Grande
1, 49	Barrocadas
136	Cacequi
2, 3, 8, 21, 30, 45,	Capivari
152,	Dom Pedrito
117, 120, 138	Itaqui
107, 109, 112, 114, 115, 116	Jaguarão
86	Palmares
142	Rosário do Sul
128, 129, 133	Santa Eulália
Hellodes	Santa Vitória do Palmar

A identificação morfológica das espécies de capim-arroz foi realizada considerando os parâmetros utilizados nas chaves taxonômicas de Carretero (1981), Pirola (1965) e Pfitscher & Barreto (1976). Ainda, foram utilizados parâmetros adicionais obtidos em Kissmann (1991), onde as diferenças taxonômicas são abordadas com maior especificidade para as espécies ocorrentes no Estado do RS. As características avaliadas foram divididas em avaliações realizadas a campo e em laboratório com auxílio de uma lupa, que são descritas na Tabela 2.

TABELA 2. Características morfológicas avaliadas nas plantas de capim-arroz e a respectiva chave taxonômica relacionada à característica. Porto Alegre, RS. 2013

Parâmetro	Determinação <sup>1</sup>	Chave Taxonômica <sup>2</sup>
----- Parâmetro Vegetativo -----		
Altura de planta	(cm)	a, c, d
Tamanho da bainha	(cm)	d
Tamanho da penúltima folha	(cm)	a, b, d
Largura da folha	(cm)	a, b, d
Cor da borda da penúltima folha	Coloração (P-R-V)	e
Cor da nervura da penúltima folha	Coloração (P-R-V)	e
Cor da 1ª bainha	Coloração (P-R-VE-VC)	d
Cor da 2ª bainha	Coloração (P-R-VE-VC)	d
Presença de lígula	Sim / Não	d
----- Parâmetro Reprodutivo -----		
Tamanho da panícula	(cm)	a, c
Largura da panícula	(cm)	a, c
Tamanho do pedúnculo	(cm)	e
Eixos secundários da panícula principal	Quantidade	e
Panículas por planta	Quantidade	e
Tamanho do 3º eixo secundário	(cm)	e
Largura do 3º eixo secundário	(cm)	e
Tamanho das espiguetas (Meio)	(cm)	a, b, c, d
Largura das espiguetas (Meio)	(cm)	a, b, c, d
Tamanho da arista	(cm)	a, b, c, d
Tamanho gluma inferior	(cm)	a, c
Largura gluma inferior	(cm)	a, c, d
Gluma inferior glabra	Sim / Não	a, c, d
Nervuras da gluma inferior	Quantidade	a, b, c, d

<sup>1</sup> cm – centímetros; P – púrpura; R – roxo; VE – verde escuro; VC – verde claro; S – sim; N – não

<sup>2</sup> a – Pfitscher & Barreto (1976); b – Carretero (1981); c – Pirola (1965); d – Kissmann (1991); e – Característica formulada.

As avaliações a campo foram realizadas no estágio reprodutivo da planta e constaram da medição com régua do comprimento total (cm) das plantas e da largura do colmo, do comprimento da penúltima folha do colmo principal, a coloração da nervura, da

borda e do limbo folhar (Figura 1). As avaliações de características reprodutivas realizadas a campo constaram do comprimento e largura da panícula, comprimento do pedúnculo, quantidade de panículas por planta e número de eixos secundários por panícula (Figura 2). Após a realização dessas avaliações foi coletado o terceiro eixo secundário de cada panícula para análise em laboratório. Esta análise constou do comprimento e da largura do eixo secundário. Após, foi removida uma espiguetas da região central onde foram avaliados o comprimento e largura da espiguetas, da gluma superior e inferior, da lema superior e inferior e da pálea (Figura 2).

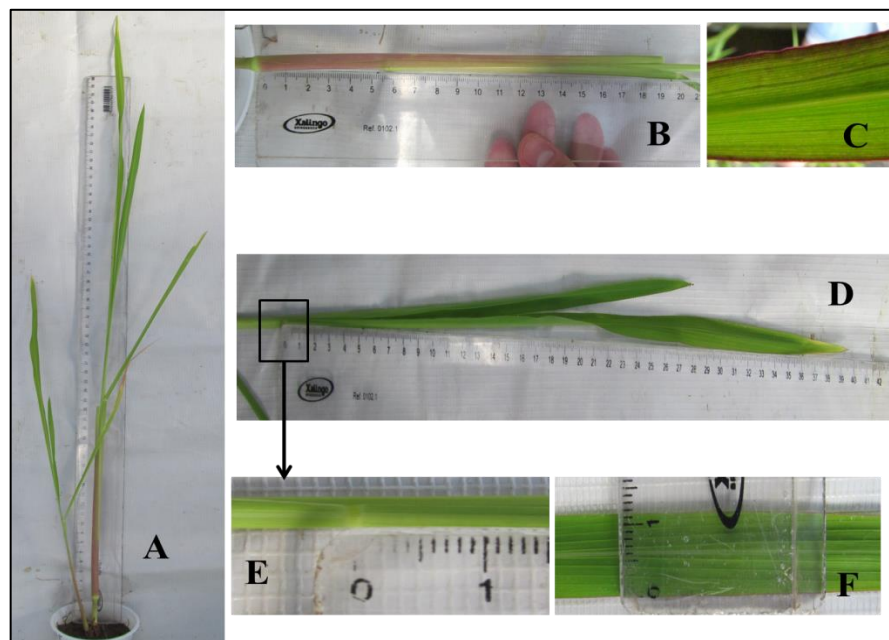


FIGURA 1. Ilustração da análise morfológica de estruturas vegetativas das plantas de capim-arroz: Altura total de planta (A); Comprimento da bainha e avaliação da cor (B); Coloração da folha, figura com as bordas roxas (C); Comprimento da folha (D); Detalhe do colarinho da folha, ponto inicial da medição (E); Largura da folha (F). Porto Alegre, RS. 2013.

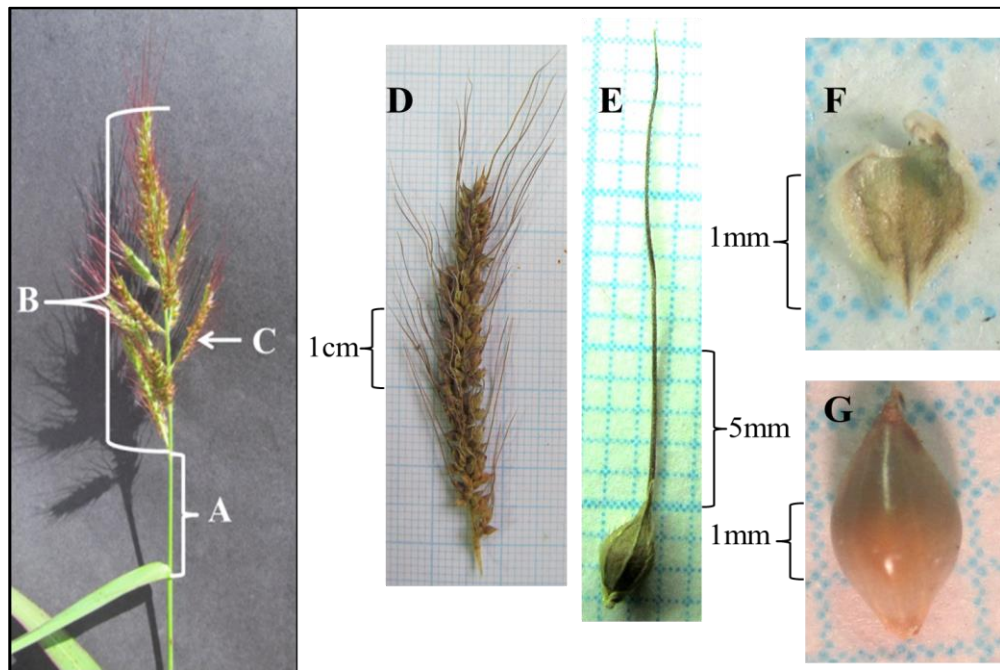


FIGURA 2. Ilustração da análise morfológica de estruturas reprodutivas das plantas de capim-arroz: Comprimento do pedúnculo (A); Comprimento da panícula (B); Eixo secundário, terceiro de baixo para cima, coletado para posterior análise (C); Comprimento e largura do eixo secundário (D); Comprimento e largura da espiguetas e comprimento da arista (E); Comprimento e largura da gluma inferior (F) e Comprimento e largura do antécio (G). Porto Alegre, RS. 2013.

As características que foram empregadas na classificação das espécies segundo as chaves taxonômicas de Kissmann (1991) e Tabacchi *et al.* (2006) foram a presença de arista, lígula, comprimento das espiguetas (G), largura de espiguetas (W), comprimento da gluma inferior (L), razão do G/L, formato das espiguetas, comprimento total da planta, comprimento da panícula e do 3º eixo secundário

### 3.1.2 Análise molecular

A análise molecular foi realizada nos 30 acessos avaliados na análise morfológica, pois apresentaram maiores variações em relação às características referentes à altura de plantas e comprimento de aristas, da panícula e espiguetas. Este estudo foi realizado no

Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS, Porto Alegre, RS.

### 3.1.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

A análise filogenética foi realizada com base na amplificação de uma região não codificante do DNA de cloroplasto (cpDNA) e de uma região do DNA nuclear. A figura 3 ilustra o intron *trn* do cloroplasto e da localização de *primers* universais utilizados em estudos filogenéticos.

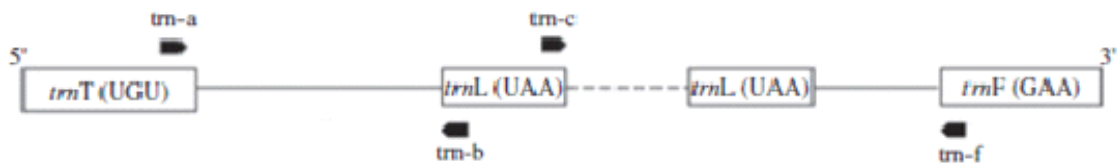


FIGURA 3. Ilustração hipotética do intron *trn* pertencente ao DNA do cloroplasto. Porto Alegre, RS. 2013.

Os *primers* universais usados (Tabela 3) são baseados em regiões não codificadas, como por exemplo o íntron *trn* pertencente ao DNA do cloroplasto que são, *trnT*(UGU) - *trnL*(UAA) (*primers* A e B) e *trnL*(UAA) - *trnF* (GAA) (*primers* C e F), descritos por Taberlet *et al.* (1991) e *primers* ITS que amplificam regiões do DNA nuclear ribossomal (nrDNA) denominados de ITS-Y4 e ITS-Y5, também utilizados em outros trabalhos de filogenia (Aoki & Yamaguchi, 2008; Kita & Ito, 2000).

TABELA 3. Sequência nucleotídica e características dos *primers* utilizados na amplificação de DNA do cloroplasto e nuclear. Porto Alegre, RS. 2013

<i>Primer</i>	Sequência	Fragmento (pb) <sup>1</sup>	Região	Referência
trn-a	CATTACAAATGCGATGCTCT	830	<i>trnT</i> - <i>trnL</i> (cpDNA)	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
trn-b	TCTACCGATTTGCCATATC			Taberlet <i>et al.</i> , 1991
trn-c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	900	<i>trnL</i> - <i>trnF</i> (cpDNA)	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
trn-f	ATTTGAACTGGTGACACGAG			Taberlet <i>et al.</i> , 1991
ITS-Y4	CCCGCCTGACCTGGGGTCGC	600	ITS (nrDNA)	White <i>et al.</i> , 1990
ITS-Y5	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA			Kita & Ito, 2000

<sup>1</sup>pb – Pares de base;

### 3.1.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

As amostras para extração de DNA foram obtidas de 150 mg de tecido foliar, coletadas individualmente de três plantas por população. As extrações de DNA foram realizadas pelo protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) modificado (Doyle & Doyle, 1987). A análise da qualidade e quantidade de DNA foi realizada através do espectrofotômetro (Genesys 2tm, Thermo Spectronic). Após quantificação, o DNA foi diluído em TE 1X e armazenado a -5°C em concentrações de 100ng/μL para amostras estoque e 25ng/μL para amostras de trabalho.

As reações da polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction) foram conduzidas no laboratório de biologia molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS, utilizando termocicladores (Mastercycler, Eppendorf). As reações foram adaptadas de Yamaguchi (2005) e seguiram o seguinte protocolo: 50ng de DNA; 0,15μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,2mM de dideoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,35 U de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,3% de DMSO 100%, 3mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 1X PCR buffer e água MiliQ para completar volume total de 30μL. O protocolo da reação de PCR foi composta por 3 minutos de desnaturação das cadeias de

DNA a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C para ocorrer o pareamento, 60 segundos a 72°C, para ocorrer à extensão da fita complementar do DNA e por fim 5 minutos a 72°C para amplificar fragmentos mais longos. Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídio na proporção de 0,02  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , por 120 minutos a 110 V em tampão TBE 0,5X (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados por comparação visual utilizando marcadores (Ladder) de 100pb (INVITROGEN). Após, cada gel foi fotografado com auxílio do programa L-PIX IMAGE Release 2.6 (Loccus Biotecnologia). Os sequenciamentos foram realizados através do equipamento 3730XL (Applied Biosystems), no laboratório da empresa MACROGEN Inc. (Gasandong, Geumcheon-gu Seoul, Korea).

### 3.1.3 Análise dos dados

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas pelo programa Mega versão 5.1, URL (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). O alinhamento foi realizado com sequências conhecidas. As sequências obtidas dos *primers* A e B foram alinhadas com as sequências AB223072 de *E. crus-galli*, AB223083 de *E. colonun* e AB223059 de *E. oryzicola*. Para os *primers* C e F utilizaram-se as sequências AB223104 e AB223134 de *E. crus-galli*, AB223115 e AB223145 de *E. colonun* e AB223091 e AB223121 de *E. oryzicola*. Do mesmo modo, as sequências obtidas dos *primers* ITS foram alinhadas com as sequências AB353389 de *E. crus-pavonis* e AB353391 de *E. colonun*. Para todos os alinhamentos, as sequências conhecidas foram obtidas no DDBJ/EMBL/GenBank (DNA Data Bank of Japan) disponível em <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/>. A análise de



agrupamento foi realizada através do programa Mega 5.1, usando o método UPGMA (Rohlf, 1990).

### **3.2 Determinação do mecanismo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr**

Este estudo foi realizado com base em três experimentos, que são relacionados a curvas de dose-resposta sobre o crescimento de planta, atividade *in vivo* da enzima ALS e sequenciamento do gene ALS. O primeiro deles foi realizado no Laboratório da Flora Ruderal (LaFlor), localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS. Este experimento consistiu na avaliação do efeito do herbicida imazethapyr aplicado em pós-emergência em plantas de capim-arroz. O segundo experimento foi realizado no LaFlor e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS e consistiu em analisar a atividade da enzima ALS quando submetida a tratamentos com o mesmo herbicida. O terceiro experimento foi realizado nos mesmos laboratórios e consistiu no isolamento e sequenciamento do gene ALS de capim-arroz, e na comparação das sequências de biótipos resistentes e suscetível com sequências padrões deste gene.

#### **3.2.1 Material Vegetal**

O material vegetal utilizado nos experimentos descritos acima corresponde a seis populações de capim-arroz (Tabela 4). Uma dessas populações é suscetível ao herbicida (SUSSP01), três são resistentes apenas aos herbicidas inibidores da ALS (PALMS01, CAMAQ01, CACHS50) e dois biótipos apresentam resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS (Imazethapyr) e ao herbicida quinclorac (ARRGR01, MOSTS51). A

suscetibilidade e resistência aos herbicidas das populações analisadas foram comprovadas em estudos anteriores (Merotto Jr. *et al.*, 2009; Mariot *et al.*, 2010). Do mesmo modo, a resposta a inibidores de metabolização foi comprovada por Matzenbacher (2012).

TABELA 4. Origem dos biótipos utilizados para determinação do mecanismo de resistência, padrão de resistência aos herbicidas inibidores da ALS e quinclorac e resposta a inibidores de metabolização. Porto Alegre, RS. 2013

População	Origem	Resistência a inibidores da ALS	Resistência a quinclorac	Mecanismo de Resistência
SUSSP01	São Paulo/SP	Não	Não	Não Apresenta
PALMS01	Palmares do Sul/RS	Sim	Não	Metabolização P450
CAMAQ01	Camaquã/RS	Sim	Não	Desconhecido
ARRGR01	Arroio Grande/RS	Sim	Sim	Metabolização P450
CACHS50	Cachoeira do Sul/RS	Sim	Não	Metabolização P450
MOSTS51	Mostardas/RS	Sim	Sim	Desconhecido

Todas as populações foram autofecundadas para reduzir a heterozigose em relação à resistência aos herbicidas. Após a colheita, as sementes foram armazenadas em sacos de papel e mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente seis meses. Em seguida, foi realizado o procedimento para superação da dormência, adubação e os demais tratamentos culturais foram os mesmos realizados no item (3.1.1). Após a germinação, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos de 200 mL, furados e preenchidos com solo, e alocadas em bandejas com lâmina d'água de 5cm. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, onde as condições ambientais foram  $30/25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  de temperatura dia/noite e fotoperíodo de 14h. O desbaste foi executado deixando uma planta por vaso e foi realizado quando as plantas apresentavam duas folhas.

### 3.2.2 Avaliação do efeito do herbicida imazethapyr em experimentos de curva de dose-resposta

O experimento foi realizado na casa de vegetação durante os meses de novembro e dezembro de 2012. Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental de blocos completamente casualizados, em um esquema fatorial 6x9, com 3 repetições. O fator A foi composto pelos biótipos descritos na Tabela 4. O fator B correspondeu as doses de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 500, 1000 e 2000 g.ha<sup>-1</sup> do herbicida imazethapyr (*Imazetapir Plus Nortox*, 106 g.L<sup>-1</sup>) equivalente a 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 5, 10 e 20 vezes a dose recomendada, respectivamente. Foi adicionado o surfactante Dash na dose de 0,5% (v/v). Os tratamentos foram realizados quando as plantas atingiram o estágio de 2 a 3 folhas totalmente expandidas.

A aplicação dos tratamentos foi realizada em câmara de aspersão de produtos químicos (Greenhouse Spray Chamber, model Generation III, Devries Manufacturing, Hollandale, MN), pressurizada com CO<sub>2</sub> a pressão constante de 35 lb.pol<sup>-2</sup>, bico Teejet® 8002 E, velocidade de deslocamento de 1,16 m.s<sup>-1</sup>, que resultou um volume de calda de 200 L.ha<sup>-1</sup>.

As avaliações foram realizadas através de controle visual aos 7, 14, 21 e 23 dias após a aplicação (DAA) e a massa seca da parte aérea, avaliada aos 23 DAA. As avaliações visuais consistiram da avaliação em escala percentual do nível de dano causado pelo herbicida às plantas, onde a nota zero equivalem à ausência de danos e a nota 100 à morte das plantas. Aos 23 DAA, a parte aérea das plantas foi coletada e colocada para secar em estufa com temperatura de aproximadamente 60°C até atingir peso constante para determinação da massa seca da parte aérea.

Os dados foram expressos em porcentagem da média da testemunha sem aplicação. Após os dados foram analisados com relação à normalidade e homogeneidade. Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) pelo teste F com nível de significância de 5% de probabilidade. A complementação da análise de variância foi feita pela análise de regressão, através da equação log-logística de quatro parâmetros. O modelo log-logístico, no qual se utilizam parâmetros que são biologicamente significativos quando aplicados à resposta da planta ao herbicida é o mais apropriado na análise da maioria dos estudos de dose-resposta (Seefeldt *et al.*, 1998). O modelo logístico de quatro parâmetros é dado pela fórmula:

$$f(x, (b, c, d, e)) = c + \frac{d - c}{1 + \exp \{b(\log(x) - \log(e))\}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $f(x)$  é a resposta da variável dependente a ser estimada, ou seja, a testemunha;  $c$  e  $d$  são os valores assintóticos de  $f(x)$  sendo, respectivamente, os limites inferior e superior da curva;  $b$  se refere à inclinação da curva no ponto de inflexão, quando produz a metade da resposta entre os valores inferior e superior; O parâmetro  $e$  é a dose necessária de herbicida em que é produzida a metade da resposta entre os parâmetros  $c$  e  $d$ , também conhecida como  $C_{50}$  para massa seca de planta. O modelo para o quarto parâmetro logístico foi ajustado aos dados usando o programa computacional de estatística R e o software Package *drc*. O fator de resistência (FR) foi calculado pela relação do  $GR_{50}$  do biótipo resistente /  $GR_{50}$  do biótipo suscetível. O intervalo de confiança (IC) foi calculado para significância de 95% para o  $GR_{50}$  e FR.

### 3.2.3 Atividade da enzima ALS em capim-arroz

A análise foi realizada pelo procedimento “*in vivo*” utilizando protocolo adaptado de Gerwich *et al.* (1993), que avalia de forma indireta a atividade da enzima ALS através da quantificação de acetoína originada pela descarboxilização do acetolactato na presença de ácido ascórbico (Ray, 1984). As populações de capim-arroz utilizadas e os procedimentos de crescimento das plantas são os mesmos do item 3.2.1.

O experimento foi disposto em delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições e foi conduzido em duplicata. O herbicida utilizado foi o imazethapyr (*Imazetapir Plus Nortox*,  $106 \text{ g.L}^{-1}$ ) nas doses de 0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 80 e  $1600 \text{ g.ha}^{-1}$ , que corresponde a 0, 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 vezes a dose recomendada de campo, respectivamente. Todos os tratamentos foram acrescidos de 0,5% (v/v) do surfactante Dash. A metodologia de aplicação foi realizada conforme descrito anteriormente e foram adicionados 30 mL de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950), após a aplicação.

Três horas após os tratamentos com herbicidas foi realizada a aplicação do ácido 1,1-ciclopropanodicarboxílico (CPCA) na dose de  $960 \text{ g.ha}^{-1}$ , com adição do surfactante não-iônico TritonX-100 na dose de 0,25 % (v/v). Após a aplicação, as plantas foram recolocadas na casa-de-vegetação onde ficaram por 24 horas. Nesse período as plantas receberam complementação de luminosidade com duas lâmpadas incandescentes de 90 W de potência, com finalidade de aumentar a atividade fotossintética e induzir uma maior produção de aminoácidos. Após as 24 horas as plantas foram levadas ao Laboratório de Biologia Molecular da UFRGS, onde foi coletado 400mg de tecido foliar jovem. O material vegetal foi cortado em tamanhos de 5 a 10 mm de comprimento, e colocado em um almofariz de porcelana previamente resfriado em freezer. Acrescentou-se nitrogênio

líquido para ocorrer o congelamento do tecido e assim facilitar a maceração do mesmo. Após a maceração, foi acrescentado 6 mL de solução aquosa contendo 0,25% (v/v) do surfactante não-iônico TritonX-100. O material foi homogeneizado com pistilo de porcelana e após, a solução foi submetida à filtração a vácuo utilizando um aparato específico (Figura 4) com papel filtro GF/C Whatman e coletado em um recipiente de 15 mL. Depois de filtrado, foram transferidos 3 mL da solução obtida para um recipiente de 50 mL acrescentado 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 6N e incubado em banho-maria a 60°C por 30 min. Essa adição de ácido sulfúrico encerra a reação da atividade da enzima ALS e descarboxila o acetolactato para acetoína. Após este período de incubação foi adicionado 1 mL da solução com creatina e alfa-naphtol, agitadas manualmente e novamente incubadas em banho-maria a 60°C por mais uma hora para desenvolver a coloração ideal. Esta solução deve ser preparada no momento da aplicação e corresponde a 0,09% (v/v) de creatina e 0,9% (v/v) de alfa-naphtol, dissolvidos em NaOH 2,5N. Ao término da incubação, os recipientes foram centrifugados a 15850g por 5 min a temperatura ambiente (25°C). Após, o sobrenadante foi transferido para uma cubeta plástica para realizar as leituras no espectrofotômetro (Genesys 2<sup>TM</sup>, Thermo Spectronic) utilizando comprimento de onda de 530 nm, com a finalidade de detectar a quantidade de acetoína.

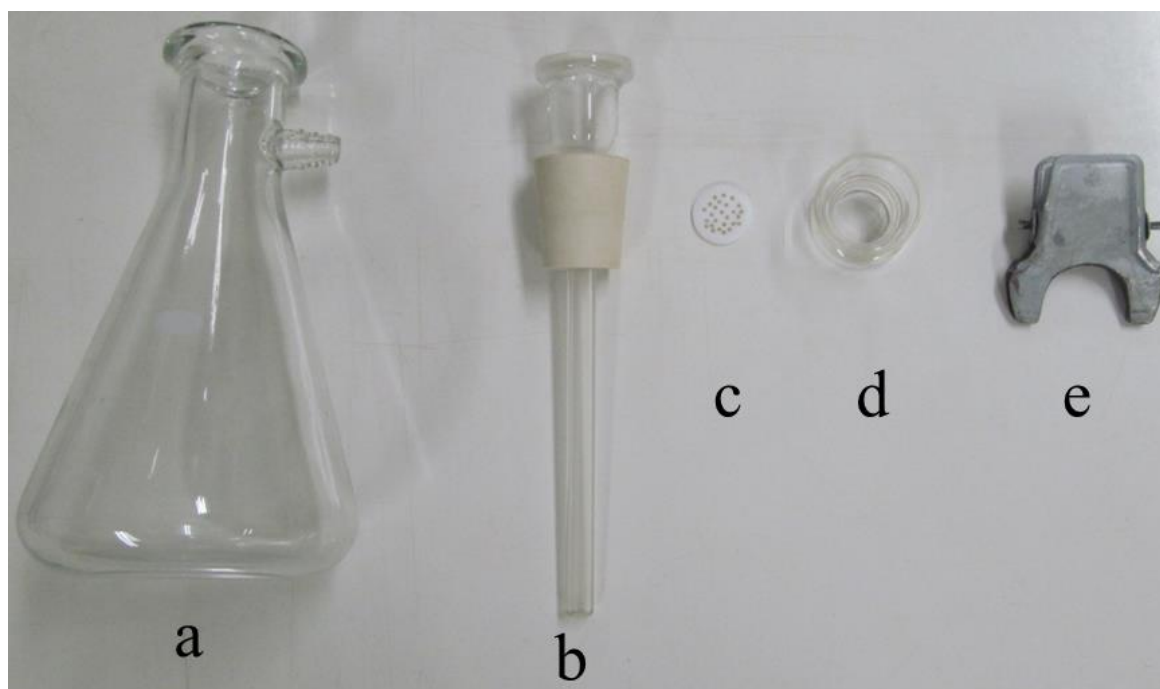


FIGURA 4. Aparato utilizado para filtração a vácuo. (a) Kitazato de 500 mL, (b) funil com rolha para vedação, (c) disco de Teflon perfurado, (d) suporte da solução e (e) presilha de prancheta adaptada. A montagem é realizada com b dentro de a, c dentro de b, d em cima de b e por fim a presilha fixando os componente b, c e d. Porto Alegre, RS. 2013.

A análise estatística foi realizada conforme descrito anteriormente no item 3.2.3. Para comparação dos resultados foi preparada uma curva padrão com acetoína comercial nas concentrações de 0, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000  $\mu\text{M}$ . Essa curva padrão da acetoína foi repetida três vezes. Para desenvolvimento da cor foi adicionado 0,09% (v/v) de creatina e 0,9% (v/v) de alfa-naphtol, dissolvidos em NaOH 2,5N. E incubado a uma temperatura de 60°C por no mínimo 15 minutos. Ao término da incubação as amostras receberam os mesmos passos do material vegetal analisado (Fischer *et al.*, 2000).

Os dados foram expressos em porcentagem da média da testemunha sem aplicação de herbicida, analisados da mesma forma que no item 3.2.2, exceto a equação log-logística foi de três parâmetros.

### 3.2.4 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz

O estudo constou do desenho de *primers* para várias regiões do gene ALS, da avaliação da eficiência desses *primers* para a amplificação dos fragmentos esperados, do isolamento desses fragmentos, sequenciamento e finalmente da identificação da ocorrência de mutações com base no alinhamento de sequências de referência. O material vegetal utilizado para esse experimento foi o mesmo utilizado nos ensaios anteriores (item 3.2).

#### 3.2.4.1 Desenho dos *primers*

Inicialmente foram alinhadas sequências nucleotídicas das seguintes espécies e respectivo número de acesso no GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Arabidopsis thaliana* L. Heynh (X51514), *Bromus tectorum* L. (AF488771), *E. phyllopogon* ALS1 (AB636580) e ALS2 (AB636581) e *Oryza sativa* L. (AY885675). O alinhamento destas sequências foi executado usando o ClustalW, disponível em (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>). Os *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer 3 plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), objetivando-se combinações de *primers* que resultassem em fragmentos de aproximadamente 500pb. Após, os *primers* foram selecionados em função da conservação entre as sequências alinhadas, tamanho de 20 pares de base, temperatura de pareamento de no mínimo 55°C e com o maior percentual de GC. (Wangkumhang *et al.*, 2007). Os *primers* desenhados foram sintetizados pela empresa Invitrogen (Carlsbad, California) (Tabela 5).



TABELA 5. Descrição dos *primers* utilizados para obtenção da sequência do gene ALS em capim-arroz e a respectiva região de domínio. Porto Alegre, RS. 2013

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do <i>primer</i> (pb) <sup>1</sup>	TP(°C) <sup>2</sup>	Fragmento	GC(%) <sup>3</sup>	Região de domínio
ECHAD-F	CATCACCAACCACCTCTCC	20	60,4	385	55	AD
ECHAD-R	AGCCATCTGCTGTTGGATGT	20	60,7		50	AD
ECHF-F	AAGGACATCCAGCAGCAGAT	20	59,8	430	50	F
ECHF-R	GCTGGATCAATGTCAATGTG	20	57,4		45	F
ECH1F-F	TTGGTGTGCGGTTTCGAT	18	61,1	553	50	F
ECH1F-R	ATGCGGATCATAGCCAACCTC	20	60,1		50	F
ECHBE-F	GTTGGGCAGCACCAGATGT	19	62,1	782	58	BE
ECHBE-R	AAGCTACTTAAGATTACCATACCAGAGT	28	56,0		36	BE

<sup>1</sup>pb – Pares de base;

<sup>2</sup>TP – Temperatura de pareamento;

<sup>3</sup>GC – Percentual de guanina e citosina.

Os *primers* que resultaram em ampliações de fragmentos com tamanho próximo ao esperado são descritos na Tabela 5. A disposição desses *primers* em relação à localização no gene ALS e os locais onde ocorreram mutações relacionadas a resistência são demonstrados na Figura 5.

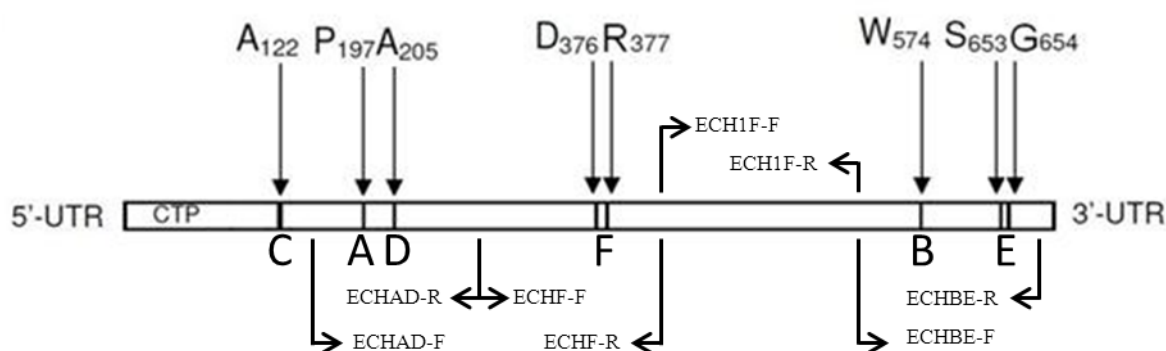


FIGURA 5. Representação esquemática do gene ALS com suas regiões de domínio (C, A, D, F, B e E) e os respectivos *primers* utilizados na amplificação. Porto Alegre, RS. 2013.

O fragmento do gene ALS relacionado à posição A<sub>122</sub> não foi passível de amplificação. Os *primers* relacionados a esta região foram obtidos a partir de estudo recentemente disponibilizado sobre a amplificação do gene ALS em capim-arroz realizado

no estado do Arkansas, Estados Unidos (Riar *et al.*, 2013). Estes *primers* correspondem às sequências BYG\_F12 5' GCAAGGGCGCCGACATCCT e BYG\_R12 5' CCTGCTTGCAAAAGCCTCAAT.

#### 3.2.4.2 Extração de DNA e amplificação do gene ALS

As amostras para extração de DNA foram obtidas a partir de 150 mg de tecido foliar de uma planta das populações citadas anteriormente (Tabela 4). Foram avaliadas quatro plantas por população. As extrações de DNA genômico foram realizadas pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) modificado (Doyle & Doyle, 1987). A análise da quantidade de DNA foi realizada através do espectrofotômetro (Genesys 2<sup>tm</sup>, Thermo Spectronic). Após a quantificação, o DNA foi diluído em TE 1x e armazenado a -5°C em concentrações de 100ng/μL para amostras estoque, e 25ng/μL para amostras de trabalho.

As amplificações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf). As reações foram adaptadas de Merotto *et al.* (2009) e seguiram o seguinte protocolo: 50ng de DNA; 0,15μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,2mM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,35 U de Taq DNA polimerase, 1,3% de DMSO 100%, 2mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 1X PCR buffer e água MiliQ para completar volume total de 30μL. O protocolo da reação de PCR foi composta por 3 minutos de desnaturação das cadeias de DNA a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C para ocorrer o anelamento, 90 segundos a 72°C para ocorrer a extensão da fita complementar do DNA e, por fim, 10 minutos a 72°C para finalização. Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídio na proporção de 0,02 μL mL<sup>-1</sup>, por 120 minutos a 110 V, em tampão TBE 0,5X (40 mM Tris,

1mM EDTA, pH=8,0). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados por comparação visual utilizando marcadores (*Ladder*) de 100pb (Invitrogen). Posteriormente, os géis foram fotografados com auxílio do programa L-PIX IMAGE Release 2.6 (Loccus Biotecnologia).

### 3.2.4.3 Purificação e análise das regiões amplificadas do gene ALS

As reações de PCR que resultaram em produtos de amplificações únicos foram purificados direto da reação, adicionando o mesmo volume da reação amplificada de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada durante 2 min, centrifugada a 11595 g durante 5 min em temperatura ambiente. Após a centrifugação houve a separação da solução em 2 fases e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o DNA foi precipitado com o dobro do volume transferido com álcool isopropanol gelado, agitado levemente e centrifugado a 11595 g por 30 min. Nessa etapa o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70% gelado. O *pellet* foi seco por 15 min e ressuspenso em 20 µL de TE 1X. A quantificação foi realizada através do espectrofotômetro Genesys 2® (Thermo Spectronic). Após, cada amostra foi diluída para a concentração de 10 ng µL<sup>-1</sup>.

O sequenciamento das amostras foi realizado através do equipamento 3730XL (Applied Biosystems), no laboratório da empresa MACROGEN Inc. (Gasandong, Geumcheon-gu Seoul, Korea). As sequências obtidas foram averiguadas realizando blast no GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para confirmação de que se tratava de sequências do gene ALS, com a confirmação as sequências foram editadas e alinhadas pelo programa Mega versão 5.1, disponível na URL (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). O alinhamento

foi feito com as sequências conhecidas do gene ALS de *Arabidopsis thaliana* (X51514) e *O. sativa* (AB049822) e observado a ocorrência de mutações conhecidas do gene ALS relacionadas com a resistência aos herbicidas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise filogenética de *Echinochloa* spp.

Infestações de capim-arroz ocorrem em todas as safras agrícolas e em praticamente todas as lavouras de arroz irrigado do Sul do Brasil. A identificação das espécies de capim-arroz nestas lavouras não é clara e tem sido debatida por produtores e técnicos. Foram desenvolvidos dois experimentos com o objetivo de classificar as plantas de capim-arroz ocorrentes nas lavouras orizícolas do Sul do Brasil. O primeiro experimento constou da classificação dos acessos de capim-arroz em função das principais características morfológicas utilizadas em chaves taxonômicas. Após, foram selecionados acessos que obtiveram as maiores diferenças morfológicas para análise através de marcadores moleculares cpDNA e ITS.

#### 4.1.1 Avaliação de características morfológicas

As características morfológicas avaliadas foram escolhidas com base nas chaves taxonômicas de espécies do gênero *Echinochloa* de Pirola (1965), Pfitscher & Barreto (1976), Pignatti (1982) e Kissmann (1991) (Tabela 2). Além dessas, foram avaliadas outras características diferenciais que possam ser utilizadas como informação discriminatória para classificar as plantas de capim-arroz ocorrentes nas lavouras orizícolas do Sul do Brasil. Estas características morfológicas foram a cor da borda e da nervura da penúltima folha, tamanho do pedúnculo, quantidade de eixos secundários da panícula principal, quantidade

de panículas por planta, comprimento e largura do 3º eixo secundário da panícula principal (Tabela 2).

Algumas características morfológicas apresentaram-se como mais eficientes para a identificação da espécie dentre os acessos avaliados. Por exemplo, a única espécie que apresenta lígula é *E. polystachia* (Pignatti, 1965; Kissmann, 1991). No presente trabalho foi encontrado apenas um acesso onde se observou lígula e com pelos variando de 1 a 5 mm de comprimento (Figura 6). Esse acesso foi coletado em região alagada do litoral Sul de Santa Catarina.



FIGURA 6. Foto da lígula da espécie *E. polystachia*. (Valmir G. Menezes, IRGA).

Foram encontradas grandes variações das demais características morfológicas entre os acessos avaliados. A altura de planta apresentou grande variabilidade, onde na maioria das plantas analisadas exibiu menos de um metro de altura e alguns acessos ultrapassavam um metro de altura (Tabela 6). Nenhuma chave taxonômica apresenta esse parâmetro como característica discriminatória para classificação das espécies de capim-arroz. Há vários fatores que inviabilizam o uso da altura de planta como característica morfológica. Um desses fatores é a forte interferência que o ambiente exerce na expressão da característica estatura, fazendo com que as variações fenotípicas observadas não sejam herdáveis (Tasrif *et al.*, 2004). Contudo, essa característica permite certa facilidade na identificação da

espécie *E. colonun*, a qual apresenta altura entre 25-90 cm e, dificilmente, ultrapassa um metro de altura (Kissmann, 1991; Pfitscher & Barreto, 1976, Pignatti, 1982 e Pirola, 1965). Porém, para outras espécies esta análise é dificultada como no caso de *E. crus-galli* que apresenta plantas com altura que varia de menos de um a mais de dois metros de altura (Pfitscher & Barreto, 1976; Kissmann, 1991). Entretanto, na Grécia as espécies de capim-arroz *E. crus-galli*, *E. oryzoides* e *E. phyllopogon* analisadas, apresentaram 136-145, 116-123 e 89-96 cm de altura, respectivamente (Damalas *et al.*, 2008), demonstrando neste caso a possibilidade de utilização deste parâmetro como discriminador destas espécies.

A largura e o comprimento da penúltima folha apresentaram uniformidade entre as espécies não podendo ser utilizada como parâmetro classificatório ou discriminatório (Tabela 6). Entretanto, experimento analisando essas características indicou que as espécies *E. crus-galli*, *E. oryzoides* e *E. phyllopogon* apresentaram respectivamente 1,2; 1 e 0,8 cm de largura e 42, 39 e 31 cm de comprimento (Damalas *et al.*, 2008).

As avaliações referentes à coloração da bainha, das folhas e das espiguetas apresentaram bastante variabilidade entre os acessos analisados (Tabela 6). Coloração das folhas pode ser utilizada para classificar a espécie *E. colonun*, que apresenta manchas transversais de coloração púrpura (Kissmann, 1991). No presente trabalho nenhum dos acessos apresentou esse tipo de coloração nas folhas. Porém, foi identificada a espécie *E. colonun* sem essas manchas. Desta forma, as avaliações referentes à coloração da bainha e da borda das folhas, com exceção da coloração transversal das folhas não são critérios consistentes para classificação. A coloração roxa nas bordas das folhas é facilmente encontrada nas plantas de capim-arroz. Porém esta característica somente está presente nas espécies *E. crus-galli*, *E. colonun* e *E. erecta* (Sparacino, 1994). No presente trabalho, não foi possível usar a coloração da bainha como característica classificatória porque esta é

muito variável, sendo encontrada, por exemplo, na espécie *E. crus-galli* a coloração verde-escuro a verde-roxo. Entretanto, a cor da bainha da espécie *E. crus-pavonis* foi roxo intenso facilmente perceptível no limbo foliar, diferente do encontrada em outras espécies.



TABELA 6. Características morfológicas referentes à fase vegetativa e reprodutiva dos acessos avaliados neste estudo. Porto Alegre, RS. 2013

Acesso	Comprimento (cm)			Lâmina Folhar (Penúltima)						Panícula					
	Planta	Entre nó	Bainha	Coloração		Comprimento	Largura	Coloração			Comprimento	Comp. do pedúnculo	Largura	N° de eixos 2°	N° de panículas
				Bainha				Limbo	Borda	Nervura					
1	86,0	13,2	10,2	R		31,4	1,0	V	R	VR	11,3	15,6	1,6	6,6	6,1
2	108,0	16,4	11,3	R		39,3	1,5	VE	R	VCR	11,7	15,7	1,2	20,4	7,6
8	112,3	24	16,25	R		31,85	0,9	R	R	R	11	20	2	10	2
21	80,1	13,2	10,0	R		26,6	0,9	V	R	V	9,9	12,8	1,4	10,6	9,4
30	65,1	11,6	8,8	R		23,4	0,8	VE	R	V	7,6	9,6	1,1	7,2	4,1
45	76,3	12,8	8,7	R		28,2	1,1	VR	R	R	9,0	12,8	1,6	13,3	5,0
49	98,0	16,3	10,7	V		31,9	1,2	VE	R	R	11,0	16,8	1,8	15,5	5,8
86	86,5	17,0	12,8	R		30,2	1,1	V	R	V	9,3	18,0	1,0	7,8	10,3
106	77,8	14,1	10,4	R		26,5	1,3	VR	R	R	9,4	13,3	1,3	10,9	7,1
107	80,7	15,6	9,6	V		23,2	1,1	V	V	V	9,7	17,9	1,7	9,1	12,1
109	91,1	14,6	21,0	V		30,2	1,0	V	V	V	10,8	12,4	3,9	10,8	7,0
110	91,4	12,7	10,6	R		30,8	1,0	V	V	V	11,4	11,7	1,6	11,5	8,6
111	84,3	13,6	10,9	V		33,8	1,2	V	V	V	11,6	10,1	2,0	14,2	5,4
112	72,7	12,9	8,9	R		25,5	1,0	R	R	R	7,5	12,3	1,3	9,0	4,2
114	104,0	17,1	10,0	R		27,7	1,1	V	R	V	10,6	16,8	1,5	11,3	12,5
115	86,3	14,7	11,3	R		28,8	1,1	V	R	V	10,0	14,2	1,8	11,3	7,8
116	91,6	16,3	13,2	VR		31,4	1,0	V	V	V	13,1	11,8	1,5	11,3	4,0
117	73,5	12,4	9,8	R		29,7	1,1	VR	R	R	9,0	14,1	1,3	7,8	15,5
120	89,8	16,9	10,4	R		32,1	1,0	V	R	V	11,2	15,3	2,4	11,7	9,0
128	81,8	13,1	11,6	R		32,5	1,1	VR	R	R	11,8	11,0	1,4	8,6	11,2
129	98,8	17,7	10,6	R		28,1	1,0	V	R	V	10,8	14,4	1,5	8,2	3,8
133	86,0	14,4	10,4	R		24,8	0,8	VE	VR	V	9,5	15,1	1,3	12,0	4,5
136	98,5	17,3	11,2	R		29,0	1,0	VE	R	R	12,7	15,1	2,4	12,4	8,2
138	95,7	13,3	10,7	R		31,6	1,1	VE	R	R	10,5	12,2	1,7	9,6	8,8
142	53,5	9,4	8,0	R		29,6	1,0	V	R	V	8,2	7,0	0,7	7,3	12,6
144	95,2	15,9	11,8	VR		29,6	1,1	V	V	V	10,5	13,0	1,7	8,4	7,7
152	85,7	12,9	9,8	R		33,2	1,0	VR	R	R	10,0	11,3	1,6	10,4	7,6

V – Verde; VE – Verde escuro; VR – Verde arroxeadado; R – Roxo.

Na Itália a coloração do caule e o comprimento das espiguetas explicam 30% da variabilidade total das espécies do gênero *Echinochloa* (Tabacchi *et al.*, 2006). Porém, outro trabalho também realizado na Itália descreve que a coloração das espiguetas não pode ser considerada como característica classificatória por ser encontrada indistintamente em *E. crus-galli* e *E. colonum* (Sparacino, 1994). Entretanto, outros autores citam que a coloração das espiguetas pode ser empregada como característica classificatória para diferenciar as variedades de *E. crus-galli*, sendo verde para variedade *brevisetata* e roxo para *patricola*, e essa característica é também utilizada na discriminação das espécies cultivadas *E. frumentacea* e *E. esculenta* (Shouliang & Phillips, 2006). Do mesmo modo, a coloração da panícula é utilizada como um dos critérios para diferenciar as espécies de *E. crus-galli* de *E. crus-pavonis*, sendo que *E. crus-galli* apresenta coloração verde com tons púrpuros e *E. crus-pavonis* é rósea a pálido-púrpura (Kissmann, 1991). No presente trabalho, a coloração da bainha foi muito variável e a coloração roxa foi encontrada em acessos classificados como *E. colonum*, *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis*. Porém, a maioria dos acessos com pigmentação de tons rósea na espiguetas foi classificado como *E. crus-galli* (dados não apresentados).

As características reprodutivas contribuem para melhor discriminação entre as espécies. Segundo as chaves taxonômicas de Pirola (1965), Pfitscher & Barreto (1976), Pignatti (1982) e Kissmann (1991) em *E. colonum* os eixos secundários da panícula possuem comprimento inferior a 2 cm e as espiguetas são desprovidas de aristas, enquanto que na espécie *E. crus-galli* os eixos secundários da panícula possuem comprimento de 1,6 a 4,1 cm. No entanto, essa característica não foi discriminadora das outras espécies de *Echinochloa* (Tabela 7).

O formato da gluma inferior com grandes cerdas e com três a cinco nervuras corresponde a *E. crus-galli* e/ou variedades dessa espécie e glumas glabras com poucos pelos na região central indica a ocorrência de *E. crus-pavonis* (Pignatti, 1965; Kissmann, 1991; Pfitscher & Barreto 1976), e se a altura da gluma inferior apresentar  $\frac{1}{2}$  do tamanho da espiguetta indica a ocorrência da espécie *E. oryzicola*. Essas avaliações da espiguetta foram realizadas com auxílio de uma lupa e um papel milimetrado para facilitar a avaliação do comprimento, largura, número de nervuras das glumas e da presença de pelos e/ou cerdas presentes na espiguetta. Essas características podem ser utilizadas como complementares na classificação das espécies do gênero *Echinochloa* (Tabela 7). Segundo Pfitscher & Barreto (1976), a estrutura do racemo pode ser utilizado para diferenciar *E. crus-galli* de *E. crus-pavonis*, e essa característica foi consistente para diferenciação dessas espécies (Figura 7). A largura do antécio apresentou variabilidade entre os acessos avaliados, entretanto essa característica pode ser utilizada na classificação das espécies. A espécie *E. crus-galli* apresenta largura do antécio de 1,3 a 2 mm e a espécie *E. crus-pavonis* apresenta largura inferior a 1,2 mm (Tabela 7).

TABELA 7. Características morfológicas referentes à fase reprodutiva dos acessos, agrupamento segundo dendograma das sequências do cpDNA (Figura 12) e sua classificação com base nas chaves taxonômicas de Kissmann (1991) e Pignatti (1965). Porto Alegre, RS. 2013

Acesso	3º Eixo Secundário (cm)		Espiguetas Medianas (cm)		Aristas	Antécio		Gluma Inferior		Grupo referente ao dendograma do cpDNA	Chave taxonômica	
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura		Comprimento	Largura	comprimento	Largura		Kissmann	Pignatti
1	2,5	0,6	0,4	0,2	Não	3,0	1,7	1,8	1,5	B3	<i>E. crus-galli</i>	Indefinido
2	3,3	0,7	0,4	0,2	Não	2,8	1,3	1,5	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
8	2,4	0,7	0,3	0,2	0,3 - 0,5	2,5	1,1	1,8	1,5	B1	<i>E. crus-pavonis</i>	<i>E. crus-pavonis</i>
21	2,8	0,8	0,3	0,2	Não	2,1	1,6	1,3	1,5	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
30	1,6	0,6	0,3	0,1	1*	2,1	1,3	1,3	1,4	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
45	1,5	0,5	0,3	0,2	Não	3,0	1,9	1,3	1,3	B3	Indefinido	<i>E. crus-galli</i>
49	3,0	0,6	0,3	0,2	1*	2,5	1,4	1,3	1,4	B3	<i>E. crus-galli</i>	Indefinido
86	2,2	0,5	0,3	0,1	1*	2,3	1,3	1,3	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
106	1,5	0,5	0,3	0,2	Não	2,5	1,8	1,3	1,3	B3	Indefinido	<i>E. crus-galli</i>
107	1,7	0,6	0,4	0,2	0,4 - 2,4	2,8	1,5	1,3	1,5	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-pavonis</i>
109	2,2	0,4	0,4	0,2	1*	2,8	1,5	1,8	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
110	3,2	0,8	0,3	0,2	1,5	2,5	1,5	1,3	1,3	B2	Indefinido	<i>E. crus-pavonis</i>
111	4,1	0,7	0,4	0,2	3,0	3,0	1,7	1,3	1,5	B3	Indefinido	<i>E. crus-pavonis</i>
112	1,8	0,5	0,3	0,2	Não	2,5	1,8	1,3	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
114	3,7	0,7	0,4	0,2	0,7 - 1	2,5	1,8	1,5	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
115	2,4	0,7	0,4	0,2	1*	2,5	2,0	1,5	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i> ou <i>E. oryzoides</i>	Indefinido
116	2,9	0,7	0,4	0,2	Não	3,0	1,8	1,3	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
117	2,6	0,6	0,3	0,2	1*	2,5	1,5	1,3	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
120	2,8	0,6	0,3	0,2	1*	3,0	1,8	1,3	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
128	2,8	0,6	0,4	0,2	1,5	2,8	1,9	1,5	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-pavonis</i>
129	2,9	0,7	0,3	0,2	0,7 - 2,2	2,5	1,5	1,3	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
133	2,4	0,6	0,3	0,2	1,8	2,9	1,4	1,5	1,2	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-pavonis</i>
136	2,2	0,7	0,3	0,2	1*	2,8	1,7	1,3	1,3	B3	Indefinido	<i>E. crus-pavonis</i>
138	1,8	0,5	0,3	0,2	1,0	2,5	1,5	1,3	1,3	B3	<i>E. crus-galli</i>	<i>E. crus-galli</i>
142	1,1	0,4	0,3	0,1	Não	2,0	1,3	1,5	1,0	A2	<i>E. colonun</i>	<i>E. colonun</i>
144	3,8	0,7	3,0	2,0	1*	3,0	1,3	1,2	1,2	B3	Indefinido	Indefinido
152	2,5	0,6	3,2	1,5	1,5	2,5	1,5	1,3	1,2	B3	<i>E. crus-galli</i> ou <i>E. crus-pavonis</i>	<i>E. crus-pavonis</i>

\* Acessos que apresentam algumas aristas no eixo secundário

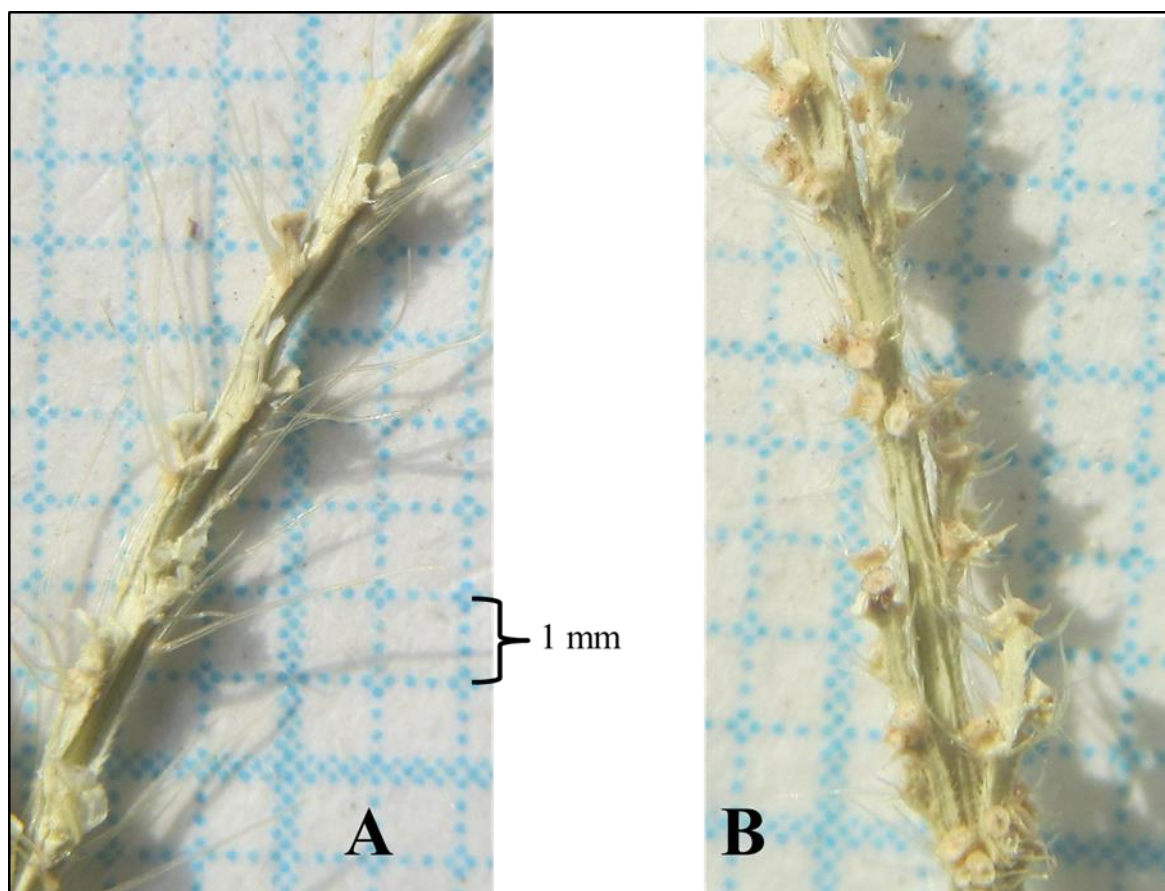


FIGURA 7. Foto do racemo das espécies *E. crus-galli* (a) e *E. crus-pavonis* (b), obtidas com auxílio de uma lupa com 40X de aumento. Porto Alegre, RS. 2013.

A característica usualmente mais empregada na diferenciação das espécies de capim-arroz pelos produtores e técnicos é a arista. No presente trabalho, ausência de arista foi observada em alguns acessos e presente em outros com comprimento que variou de 0,3 a 3 cm (Tabela 7). A espécie *E. colonum* foi a mais uniforme em relação a este parâmetro, e todos os acessos classificados como pertencendo a essa espécie eram desprovidos de aristas. Porém, a espécie *E. crus-galli* foi a que mais apresentou variação desta característica, onde classificou-se acessos pertencentes a essa espécie desprovidas de

aristas bem como com vários comprimentos e até mesmo com espiguetas com e sem aristas na mesma panícula (Tabela 7).

De forma geral, as características associadas às estruturas reprodutivas são mais informativas do que as estruturas vegetativas. As estruturas reprodutivas apresentaram menor variação em função do efeito do ambiente, e isto facilita a identificação das espécies com maior confiabilidade. No entanto, algumas plantas apresentaram características intermediárias entre duas espécies e não foram identificadas, sendo nomeadas neste caso como indefinidas (Tabela 7, Figuras 12 e 13). Por outro lado, quando essas características eram irrelevantes, a planta foi classificada como sendo da espécie com maior similaridade. A falta de consistência entre vários dos descritores taxonômicos caracteriza a dificuldade de classificação principalmente entre as espécies *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis* em situações de identificação a campo, baseado em parâmetros convencionais ou até mesmo através das chaves taxonômicas do gênero *Echinochloa*.

#### **4.1.2 Avaliação da variabilidade genética em acessos de capim-arroz**

Esta análise constou da identificação da variabilidade nucleotídica referente à região gênica entre o íntron *trnT* e o *trnL*, a qual é dividida em três segmentos não codificantes. No presente estudo, o número de nucleotídeos observados para esta região foi similar ao descrito por Yamaguchi et al; (2005) e Aoki & Yamaguchi (2008). Os *primers* *trnA* - *trnB* e *trnC* - *trnF* (Tabela 3) são amplamente utilizados em diversos estudos de filogenia, inclusive no gênero *Echinochloa*. Esses *primers* possibilitaram diferenciar à espécie *E. oryzicola* das demais espécies através do método de PCR-RFLP, comprovando que essa espécie apresenta sequência com 45 pb a mais que o restante das espécies analisadas (Mennan & Altop, 2012; Yasuda et al., 2002). A maior sequência de









grandes grupos (A e B). O grupo A é dividido em dois subgrupos A1 e A2, onde A1 é composto por três espécies *E. phyllopogon*, *E. oryzicola* e *E. helodes*. Dessas três espécies *E. phyllopogon* e *E. oryzicola* apresentam elevado valor de semelhança devido à ocorrência de sequências em tandem, indel e alterações nucleotídicas iguais, conforme apresentado nas Figuras 8, 9, 10 e 11, indicando que essas duas espécies podem ser consideradas a mesma. Essas duas espécies apresentam pequena diferença para a espécie *E. helodes* (Figura 12). Já o subgrupo A2 é composto apenas pela espécie *E. colonun*, onde as quatro sequências apresentaram elevado valor de bootstrap (97,6%). Essa espécie apresenta vários indel e alterações nucleotídicas em sua sequência (Figura 9, 10 e 11).

O grupo B é dividido em três subgrupos B1, B2 e B3. O grupo B1 é composto pela espécie *E. crus-pavonis* e uma sequência pertencente à espécie *E. crus-galli* originária da Argentina cuja sequência e descrição da identificação foi obtida do GeneBank. Porém, devido à elevada semelhança genética entre essas espécies e pela confirmação que o acesso Pop-8 é classificado como *E. crus-pavonis*, é possível ter ocorrido erro na classificação da espécie Argentina ou até mesmo que essa espécie Argentina possa ser híbrido entre *E. crus-galli* e *E. crus-pavonisi* (Figura 12). O subgrupo B2 é composto pela espécie *E. crus-galli* variedade *patricola* que pelo agrupamento do dendograma pode ser considerada uma espécie e não variedade de *E. crus-galli* (Figura 12). E por fim, o subgrupo B3 que é composto por *E. oryzoides*, *E. esculenta* e, principalmente, por *E. crus-galli* e suas variedades. A similaridade das sequências e o agrupamento no dendograma, indica que existe grande semelhança entre as espécies ou até mesmo podem ser consideradas a mesma espécie (Figura 8, 9, 10, 11 e Tabela 12). Esses casos de duas ou mais espécies de capim-arroz apresentar semelhança morfológica e genética, podendo se tratar da mesma espécie, é

também sugerido em outros trabalhos (Yabuno, 1962; Yamaguchi *et al.*, 2005; Aoki & Yamaguchi, 2008).

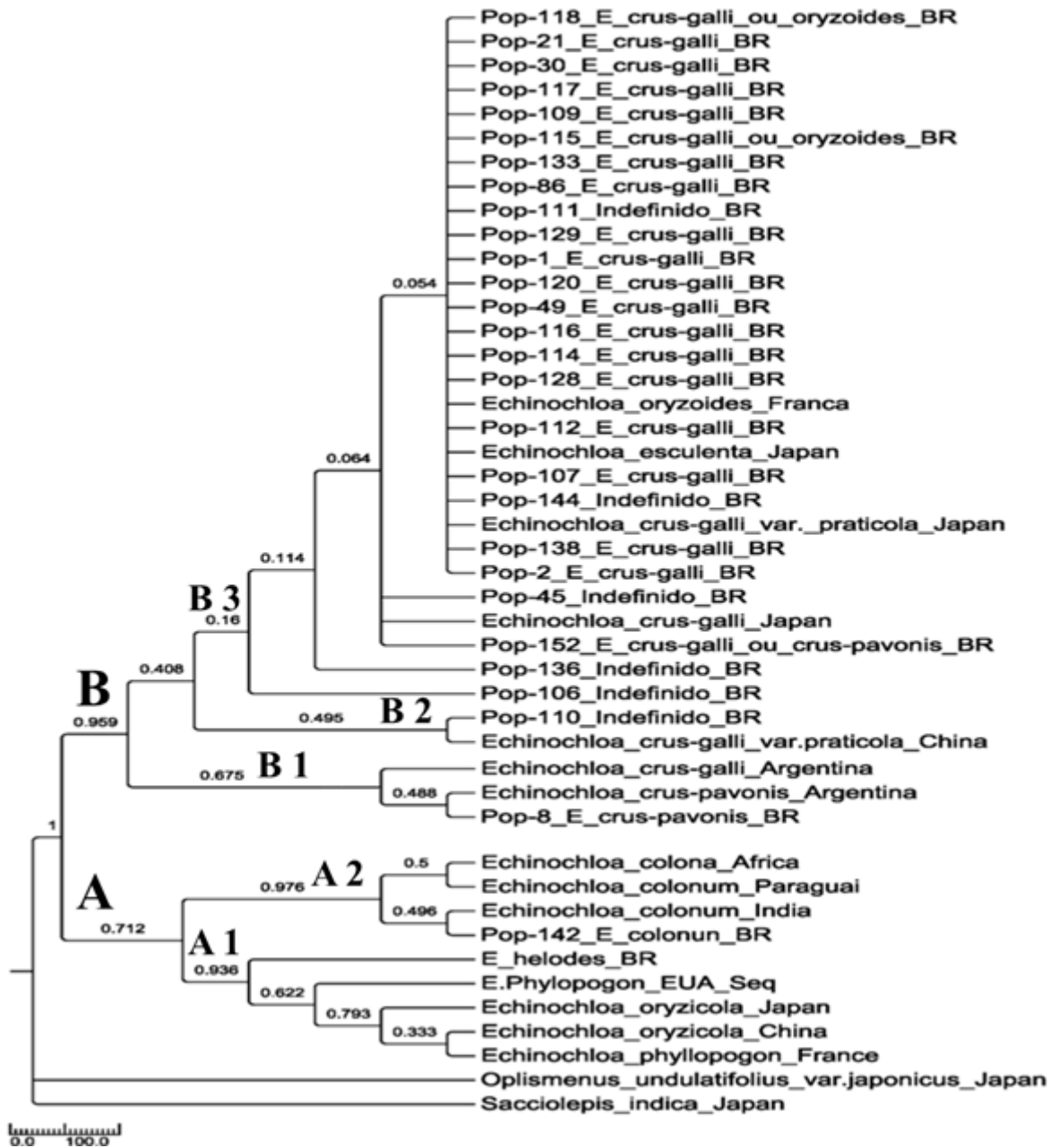


FIGURA 12. Dendrograma realizado com acessos de *Echinochloa* originados de lavouras do RS (classificação original com base na análise morfológica e descritos com a denominação “BR” após o nome). Sequências de cpDNA de diversas espécies do gênero *Echinochloa* foram utilizadas como critério de agrupamento. Porto Alegre, RS. 2013.

As sequências dos *primers* ITS também geraram um dendograma onde o gênero *Echinochloa* apresentou um grupo com 100% de suporte por bootstrap (Figura 13). Porém, diferente das combinações de *primers* utilizadas para amplificar regiões genômicas do cloroplasto (cpDNA), esses *primers* amplificam regiões do DNA nuclear que apresentam taxa de evolução cinco vezes mais rápida que o cpDNA (Clegg & Zurawski, 1992). O dendograma gerado a partir das sequências desses *primers* apresenta quatro grandes grupos A, B, C e D. O grupo A é composto por *E. colonun* e *E. helodes*, essas duas espécies apresentaram elevada semelhança em suas sequências (Figura 8, 9, 10, 11 e 13). O grupo B consistiu novamente das *E. crus-pavonis* e *E. crus-galli* originária da Argentina, confirmando a suspeita gerada com as informações dos *primers* do cpDNA descrito anteriormente (Figura 12 e 13). O grupo C é constituído por seis acessos originários do Brasil. Desses, cinco foram classificados como *E. crus-galli* e um ficou sem definição, o que provavelmente indica pertencer à mesma espécie (Figura 13). O grupo D é dividido em dois subgrupos D1 e D2, onde D1 é formado por várias espécies, *E. oryzoides*, *E. phyllopogon*, *E. sculenta*, *E. oryzicola* e *E. crus-galli* var. *patricola*, indicando elevada taxa de semelhança entre as espécies e inviabilizando o uso desses *primers* como classificadores para essas espécies (Figura 13). E por fim, o subgrupo D2 que apresenta uma sequência de *E. oryzoides* e o restante dos acessos Brasileiros foram classificados morfológicamente como *E. crus-galli*. Como discutido anteriormente essas duas espécies podem ser sinônimos, o que é reforçado com as informações geradas com as sequências obtidas com os *primers* ITS (Figura 13).

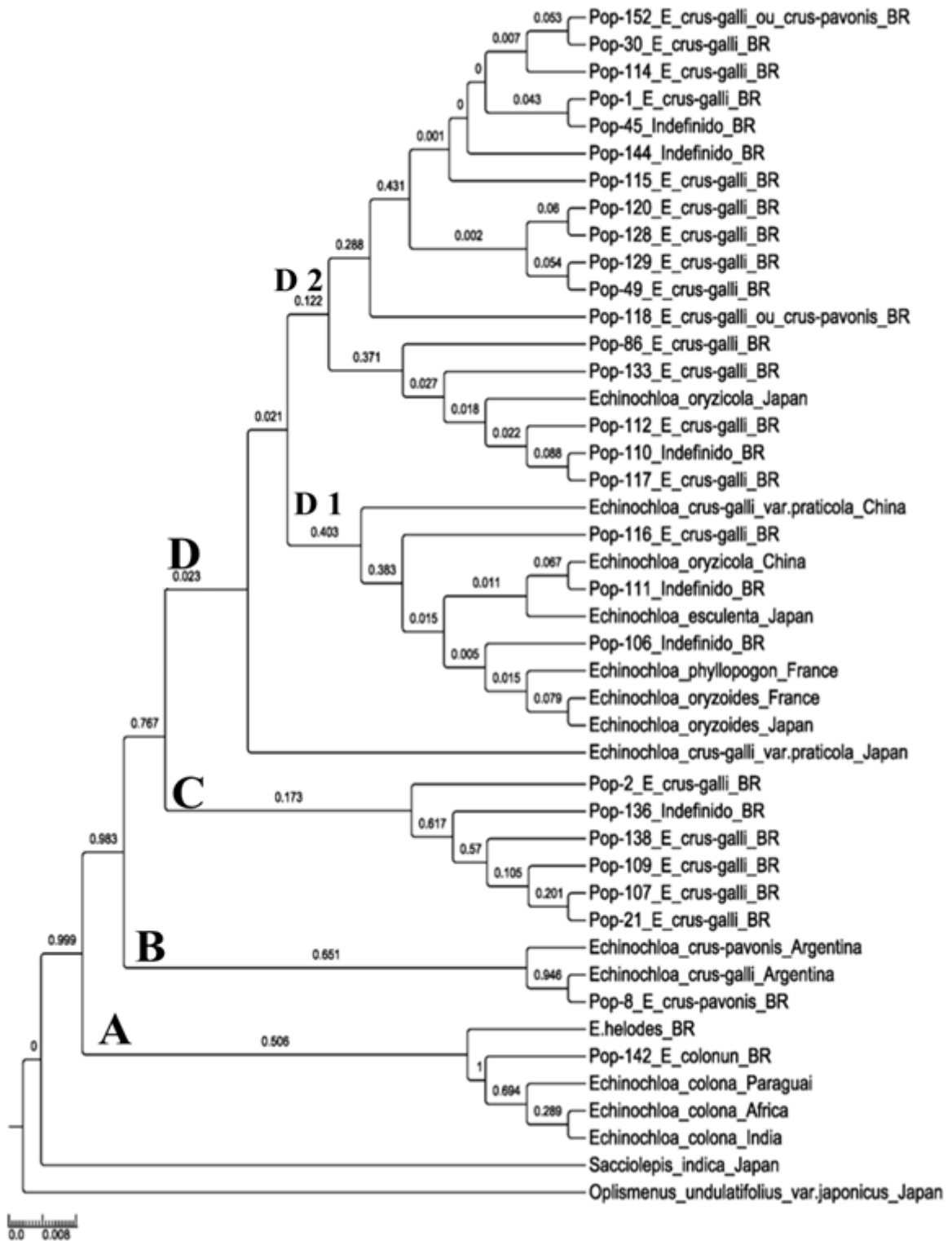


FIGURA 13. Dendrograma realizado com acessos de *Echinochloa* originados de lavouras do RS (classificação original com base na análise morfológica e descritos com a denominação “BR” após o nome). Sequências de ITS de diversas espécies do gênero *Echinochloa* foram utilizadas como critério de agrupamento. Porto Alegre, RS. 2013.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Aoki & Yamaguchi (2008), que indicam que as espécies *E. oryzicola* e *E. phyllopogon* são sinônimos. Da mesma forma, as espécies *E. crus-galli* e *E. oryzoides* por estarem agrupadas podem ser consideradas a mesma espécie. O mesmo resultado foi encontrado por Yamaguchi *et al.* (2005), onde as espécies *E. esculenta*, *E. crus-galli* e *E. oryzoides* podem ser consideradas a mesma espécie.

#### **4.2 Determinação do mecanismo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazethapyr**

Foram desenvolvidos três experimentos com o objetivo de identificar o mecanismo que confere resistência às plantas de capim-arroz aos herbicidas inibidores da ALS. O primeiro foi um experimento de curva dose-resposta, que teve a finalidade de identificar o nível de resistência dos biótipos resistentes em comparação com o suscetível. Posteriormente, foi realizada a avaliação da atividade da enzima ALS, que é uma forma de discriminar a superexpressão da enzima ALS e a ocorrência de alterações de sua sensibilidade aos herbicidas. Por fim, foi sequenciado o gene ALS dos biótipos utilizados no experimento de curva dose-resposta e alinhado com sequência padrão do gene ALS, a fim de identificar a ocorrência de mutação nas regiões que conferem resistência aos herbicidas.

#### **4.2.1 Curva dose-resposta para determinação do nível de resistência ao herbicida imazethapyr**

Foi verificada a existência de interação significativa entre os fatores biótipos e dose para as variáveis de controle avaliadas visualmente aos 7, 14, 21 e 23 DAA e para a massa seca da parte aérea, avaliado aos 23 DAA (Apêndice 1). Assim, será apresentada a comparação entre os seis biótipos de capim-arroz em relação ao aumento da dose de imazethapyr nas quatro épocas de avaliação visual e na avaliação de massa seca da parte aérea. Os dados obtidos dessas avaliações foram ajustados ao modelo sigmoidal de quatro parâmetros.

Na avaliação realizada aos 7 DAA (Figura 14A; Tabela 8), o ajuste pela equação logística de quatro parâmetros para o biótipo suscetível (SUSSP01) não proporcionou a obtenção de significância do parâmetro  $C_{50}$ , e por isso, inviabilizou a análise comparativa entre este e os demais biótipos resistentes. O parâmetro  $C_{50}$  corresponde à dose eficaz que resulta em 50% da resposta da variável analisada (Ritz, 2005). Esse problema é devido, provavelmente, ao pouco tempo decorrido após a aplicação do herbicida imazethapyr. A ação deste herbicida ocorre logo após a aplicação, todavia, os sintomas começam a aparecer no período de sete a 14 dias após a aplicação, sendo que em baixas temperaturas, esse período pode ser ainda maior (Vidal & Merotto Jr., 2001).

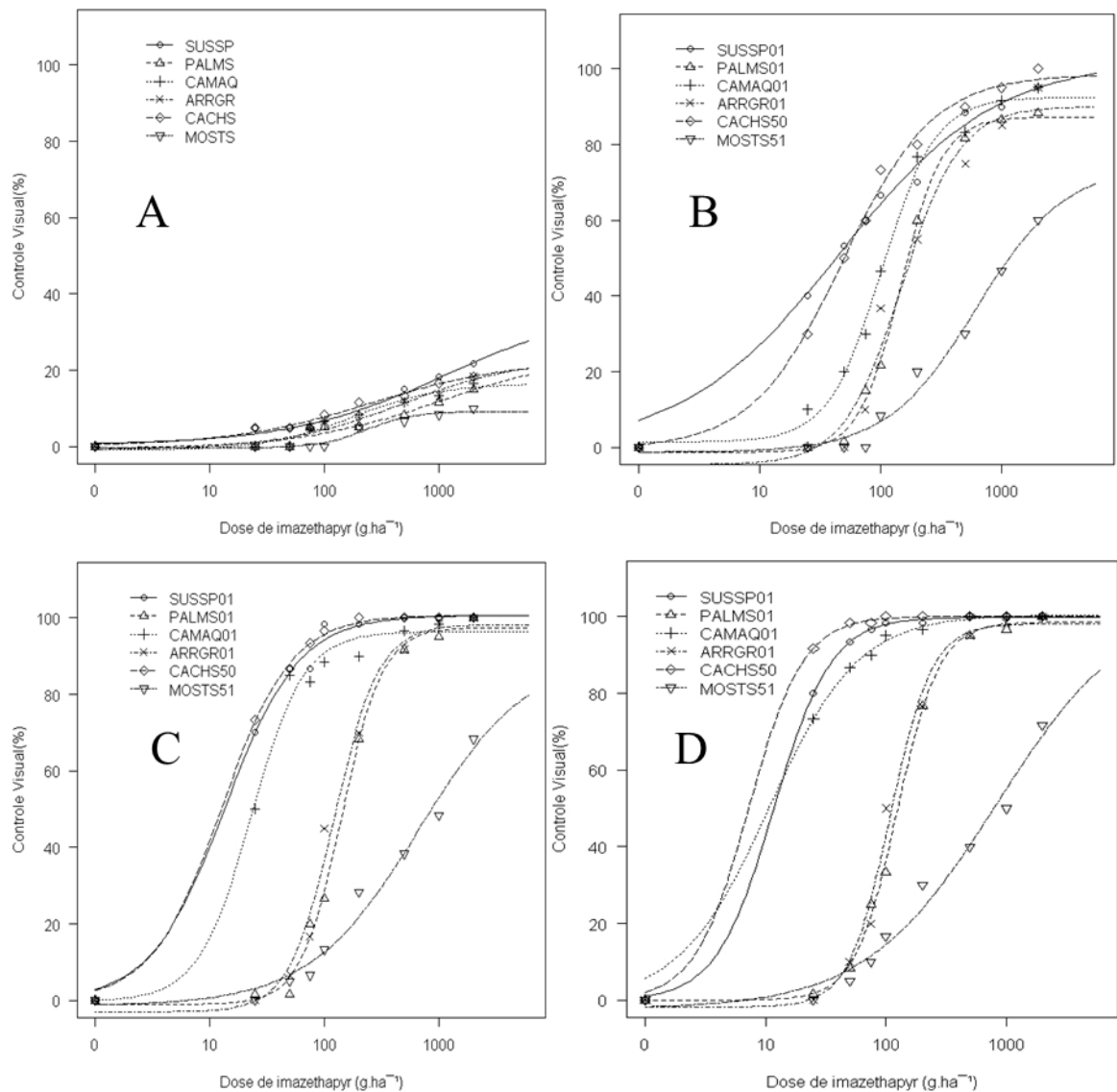


FIGURA 14. Controle visual (%) de seis biótipos de capim-arroz em função de diferentes concentrações do herbicida imazethapyr, aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 23 DAA (D). As equações correspondentes encontram-se na Tabela 8. Porto Alegre, RS. 2013.



TABELA 8. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para as variáveis controle visual, aos 7, 14, 21 e 23 DAA e massa seca da parte aérea de seis biótipos de capim-arroz, aos 23 DAA, submetido a diferentes doses do herbicida imazethapyr. Porto Alegre, RS. 2013

Biótipo	$b^{1/}$	$c^{2/}$	$d^{3/}$	$C_{50}$ ou $GR_{50}^{4/}$		Fator de Resistência <sup>7/</sup>	
				Dose <sup>5/</sup>	IC <sup>6/</sup> 95%	FR <sup>7/</sup>	IC <sup>6/</sup> 95%
----- 7 DAA -----							
SUSSP01	-0,6368**	0,4482 <sup>NS</sup>	37,324*	1164,891 <sup>NS</sup>	(-3393,334; 5723,114)		
PALMS01	-0,7022**	-0,5062 <sup>NS</sup>	24,640 <sup>NS</sup>	1064,337 <sup>NS</sup>	(-3435,806; 5564,466)	0,91 <sup>NS</sup>	(-5,334; 6,154)
CAMAQ01	-1,1343**	-0,9594 <sup>NS</sup>	16,557**	179,128**	(6,484; 351,776)	0,15**	(-0,471; 0,771)
ARRGR01	-0,8086**	-0,8602 <sup>NS</sup>	23,344**	481,290 <sup>NS</sup>	(-523,990; 1486,570)	0,41 <sup>NS</sup>	(-1,404; 2,224)
CACHS50	-0,7045**	0,1685 <sup>NS</sup>	22,707**	259,172 <sup>NS</sup>	(-263,516; 781,856)	0,22*	(-0,749; 1,189)
MOSTS51	-2,0409 <sup>NS</sup>	-0,3718 <sup>NS</sup>	9,261**	233,358*	(-38,882; 505,602)	0,2*	(-0,620; 1,020)
----- 14 DAA -----							
SUSSP01	-0,6706**	-0,0636 <sup>NS</sup>	102,493**	45,872**	(24,146; 67,594)		
PALMS01	-2,5184**	-1,2434 <sup>NS</sup>	87,264**	147,189**	(128,300; 166,080)	3,21**	(1,644; 4,776)
CAMAQ01	-1,9637**	1,4639 <sup>NS</sup>	92,487**	102,255**	(88,132; 116,368)	2,23**	(1,136; 3,324)
ARRGR01	-1,8129**	-4,5153*	90,050**	149,771**	(122,280; 177,260)	3,26**	(1,595; 4,492)
CACHS50	-1,1605**	-0,2490 <sup>NS</sup>	98,493**	48,542**	(38,424; 58,656)	1,06 <sup>NS</sup>	(0,513; 1,607)
MOSTS51	-1,1715**	-1,2312 <sup>NS</sup>	74,573**	614,789**	(140,870; 1088,710)	13,4*	(1,270; 25,529)
----- 21 DAA -----							
SUSSP01	-1,3439**	-0,0288 <sup>NS</sup>	100,642**	13,576**	(8,052; 19,088)		
PALMS01	-2,4416**	-1,0102 <sup>NS</sup>	97,477**	142,072**	(126,212; 157,928)	10,46**	(6,036; 14,884)
CAMAQ01	-1,8977**	-0,1737 <sup>NS</sup>	96,409**	23,025**	(19,093; 26,947)	1,7*	(0,954; 2,446)
ARRGR01	-2,2288**	-2,9616 <sup>NS</sup>	98,233**	122,127**	(107,888; 136,372)	9**	(5,197; 12,803)
CACHS50	-1,4257**	-0,0254 <sup>NS</sup>	100,692**	12,711**	(6,993; 18,427)	0,94 <sup>NS</sup>	(0,368; 1,512)
MOSTS51	-0,9045**	-1,3174 <sup>NS</sup>	90,986**	673,940*	(-110,648; 1458,528)	49,64*	(-11,579; 110,859)
----- 23 DAA -----							
SUSSP01	-1,8334**	-0,0328 <sup>NS</sup>	99,849**	11,682**	(5,441; 17,919)		
PALMS01	-2,4940**	0,0308 <sup>NS</sup>	98,595**	124,440**	(114,100; 134,780)	10,65**	(4,884; 16,416)
CAMAQ01	-1,1767**	-0,0328 <sup>NS</sup>	100,485**	10,736**	(5,669; 15,811)	0,92 <sup>NS</sup>	(0,274; 1,566)
ARRGR01	-2,5271**	-1,7856 <sup>NS</sup>	98,138**	109,266**	(100,446; 118,094)	9,35**	(4,304; 14,396)
CACHS50	-1,9448 <sup>NS</sup>	-0,0251 <sup>NS</sup>	100,092**	7,247 <sup>NS</sup>	(-7,763; 22,263)	0,62 <sup>NS</sup>	(-0,921; 2,161)
MOSTS51	-0,7965**	-2,2272 <sup>NS</sup>	104,296**	827,194*	(-159,424; 1813,804)	70,81 <sup>NS</sup>	(-21,826; 163,446)
----- Massa seca da parte aérea -----							
SUSSP01	1,2665**	3,7228**	100,67**	6,9635*	(-0,447; 14,367)		
PALMS01	2,1085**	6,0475**	97,821**	139,79**	(125,747; 153,833)	20,07*	(-1,405; 41,545)
CAMAQ01	-0,5438**	-0,0127 <sup>NS</sup>	99,999**	5,1794**	(0,433; 9,927)	0,74 <sup>NS</sup>	(-0,304; 1,784)
ARRGR01	1,8890**	9,3723**	100,97**	120,05**	(106,951; 133,149)	17,24*	(-1,203; 35,683)
CACHS50	0,9635**	6,5613**	99,668**	7,4796**	(1,564; 13,396)	1,074 <sup>NS</sup>	(0,932; 1,216)
MOSTS51	1,4743**	2,5587 <sup>NS</sup>	98,382**	699,92**	(453,299; 946,681)	100,51*	(-12,235; 213,255)

$b^{1/}$  Declividade da curva;  $c^{2/}$  Limite inferior;  $d^{3/}$  Limite superior;  $C_{50}$  ou  $GR_{50}^{4/}$  Dose do herbicida imazethapyr que causa 50% de efeito no fator analisado; Dose<sup>5/</sup> Dose em g.ha<sup>-1</sup>; IC<sup>6/</sup> 95% Intervalo de confiança a 5% de probabilidade; FR<sup>7/</sup> fator de resistência =  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  do biótipo avaliado/  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  do biótipo suscetível (SUSSP01).

\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; <sup>NS</sup> Não significativo a 5%.

A avaliação do controle visual realizado aos 14 DAA indicou a ocorrência de sensibilidade diferenciada ao herbicida imazethapyr entre os biótipos avaliados (Figura 14B; Tabela 8). Nesta avaliação, a análise comparativa do intervalo de confiança do  $C_{50}$  confirmou a resistência nos biótipos PALMS01, ARRGR01 e MOSTS51. Destes, o biótipo MOSTS51 apresentou fator de resistência 13. Nesta avaliação não foi possível confirmar a resistência à imazethapyr para o biótipo CACH50. Isso ocorreu porque o intervalo de confiança do parâmetro  $C_{50}$  desse biótipo não diferiu do intervalo de confiança do padrão suscetível (SUSSP01) utilizado nesse experimento (Tabela 8).

Nas avaliações de controle visual realizados aos 21 e 23 DAA e na avaliação de massa seca da parte aérea aos 23 DAA, foram observados aumento nos níveis de resistência dos biótipos que se apresentaram resistentes aos 14 DAA (Figura 14C e D, 16 e Tabela 8). Isso confirma que os biótipos PALMS01, ARRGR01 e MOSTS51 são resistentes ao herbicida imazethapyr, os quais apresentaram um  $GR_{50}$  (dose necessária para redução de 50% do crescimento) na avaliação de massa seca da parte aérea de 140, 120 e 700 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 15 e Tabela 8). Outro trabalho também identificou populações de capim-arroz com elevados níveis de resistência aos herbicidas pertencentes ao grupo químico da TPs e IMIs, apresentando  $GR_{50}$  de 653 e 576 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Panozzo *et al.*, 2013).

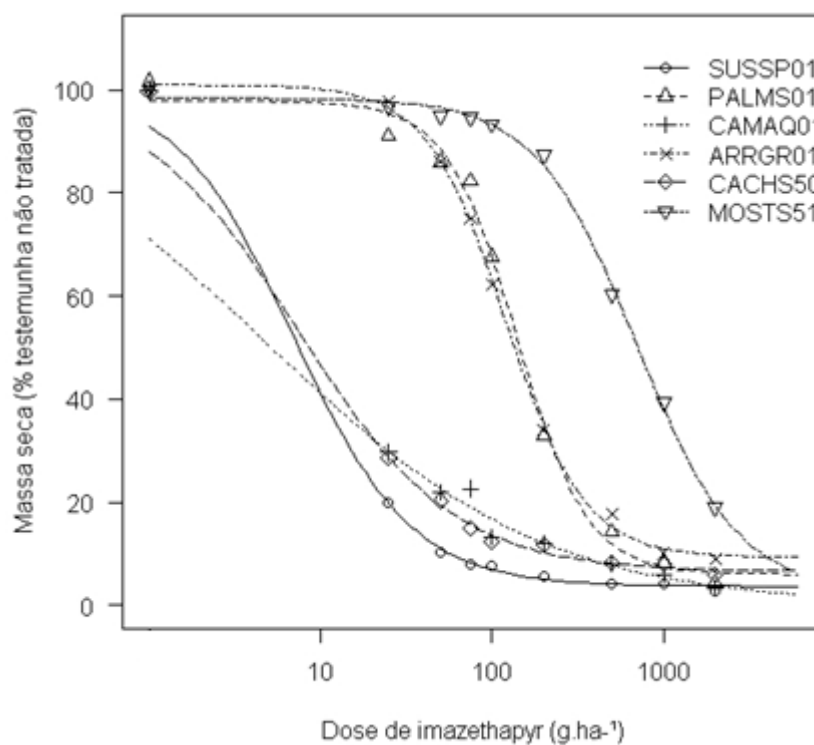


FIGURA 15. Massa seca da parte aérea (%) de seis biótipos de capim-arroz, em relação à testemunha não tratada, em função de diferentes doses do herbicida imazethapyr, aos 23 DAA. Equações correspondentes encontram-se na Tabela 8. Porto Alegre, RS. 2013.

A redução da massa seca da população suscetível (SUSSP01) não diferiu dos biótipos CAMAQ01 e CACHS50 (Figura 15) nem o FR (Tabela 8). Os biótipos ARRGR01 e PALMS01 apresentaram FR de 17,2 e 20, respectivamente. Trabalho realizado anteriormente, utilizando os mesmos biótipos, confirmou que PALMS01 e ARRGR01 apresentam resposta ao mecanismo de resistência relacionado à metabolização dos herbicidas (Matzenbacher, 2012). Neste trabalho as aplicações prévias de malathion reduziram o FR em 1,46 vezes quando comparado ao mesmo biótipo sem a aplicação do malathion, esse valor corresponde a uma redução de 31% do  $C_{50}$ . Outro trabalho realizado com os herbicidas inibidores da ALS em capim-arroz demonstrou que uma população obteve incremento de controle com aplicação prévia de malathion, passando de 80% para

100% de controle. Isso sugere que o mecanismo de metabolização do herbicida realizado pelas enzimas P450 é responsável por conferir algum nível de resistência a esta população (Riar *et al.*, 2012a).

Na avaliação aos 21 DAA o nível de controle aumentou com o incremento da dose do herbicida, sendo que o controle de 100% para os biótipos SUSSP01 e CACHS50 ocorreu com a dose de 100 g.ha<sup>-1</sup>, para PALMS01 e ARRGR01 com dose maior ou igual a 1000 g.ha<sup>-1</sup> e para a população MOSTS51 o controle não ultrapassou os 80% mesmo com a dose de 2000 g.ha<sup>-1</sup> (Figuras 15D e Tabela 8). O biótipo MOSTS51 apresentou FR 112 (Tabela 8). De todos os biótipos analisados esse foi o que apresentou a maior resistência ao herbicida imazethapyr, sendo necessária dose de 700 g.ha<sup>-1</sup> para controlar 50% das plantas (Tabela 15D e 16). Em *Bidens subalternans* (DC.) a dose de 100 g.ha<sup>-1</sup> de imazethapyr reduziu a massa seca da parte aérea do biótipo suscetível em 97% e para o biótipo resistente foram necessários 6784 g.ha<sup>-1</sup> para reduzir em 88% (Lamego, 2008). Em *Amaranthus tuberculatus* (Moq.), não foi obtido o GR<sub>50</sub> porque não houve redução da parte aérea mesmo na dose de 7000 g.ha<sup>-1</sup> (Patzoldt & Tranel, 2007). Esses trabalhos confirmam que o ensaio de curva dose-resposta é confiável e indica o nível de resistência das populações, indicando o uso desse procedimento para a discriminação das plantas resistentes e suscetíveis bem como o nível da resistência (Kuk *et al.*, 2003).

De acordo com os resultados observados, confirmou-se que os biótipos PALMS01, ARRGR01 e MOSTS51 são resistentes ao herbicida imazethapyr. Dentre esses, os biótipos PALMS01 e ARRGR01 apresentaram resistência devido à metabolização do herbicida imazethapyr (Matzenbacher, 2012). O biótipo MOSTS51 apresenta elevado FR, e por não ter apresentado resposta aos inibidores de metabolização, sugere-se que a resistência é devida a mutação no local de ação do herbicida.

#### 4.2.2 Avaliação do efeito do herbicida imazethapyr na atividade da enzima ALS em diferentes populações de capim-arroz

Foi verificada a existência de interação significativa entre os fatores biótipo x dose para a atividade da enzima ALS (Apêndice 2). Assim, será apresentada a comparação entre os seis biótipos de capim-arroz em relação ao aumento da dose de imazethapyr. Os dados obtidos dessas avaliações foram ajustados ao modelo sigmoidal de três parâmetros. Ensaio *in vivo* da enzima ALS apresenta a finalidade de determinar a atividade da enzima ALS. Essa determinação é feita pela detecção do acúmulo de acetoína que ocorre pela aplicação foliar do inibidor da KARI (CPCA). Esse inibidor interrompe a conversão de acetolactato para dihidroxiisovalerato, resultando assim no acúmulo de acetolactato que é convertido em acetoína (Corbett & Tardif, 2006) a qual é quantificada colorimetricamente em espectrofotômetro (Westerfeld, 1945).

Os biótipos CAMAQ01 e CACHS50 apresentaram valores de  $I_{50}$  de respectivamente 11,6 e 9,7 g.ia.ha<sup>-1</sup>, que são superiores ao do biótipo suscetível SUSSP01 que apresentou  $I_{50}$  de 5,1 g.ia.ha<sup>-1</sup> (Tabela 9). Entretanto, esses dois biótipos apresentaram curvas similares ao do biótipo SUSSP01 (Figura 16). Dos três biótipos que foram resistentes no experimento de curva dose-resposta (Figura 14, 16 e Tabela 8) apenas PALMS01 e MOSTS51 apresentaram resposta no experimento de atividade da enzima ALS (Figura 16 e Tabela 9). O biótipo ARRGR01 foi mais suscetível que o biótipo SUSSP01, apresentando  $I_{50}$  de 0,236 g.ia.ha<sup>-1</sup> (Figura 16 e Tabela 9), resultado que exclui local de ação alterado como mecanismo de resistência desse biótipo. Outro trabalho utilizando herbicida inibidor da enzima ALS em experimento de curva dose-resposta identificou uma população de capim-arroz com fator de resistência (FR) de 9,4 vezes (Riar

*et al.*, 2012a) porém, analisando na atividade da enzima ALS, o FR não foi significativo (Riar *et al.*, 2013).

TABELA 9. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para atividade da enzima ALS de seis biótipos de capim-arroz, submetidos a diferentes doses do herbicida imazethapyr. Porto Alegre, RS. 2013

Biótipo	$b^{1/}$	$d^{2/}$	$C_{50}$ ou $GR_{50}^{3/}$		Fator de Resistência	
			Dose $^{4/}$	IC $^{5/}$ 95%	FR $^{6/}$	IC $^{5/}$ 95%
SUSSP01	0,329**	101,58**	7,483**	(5,181; 9,785)		
PALMS01	0,329**	105,06**	122,53**	(89,629; 155,431)	16,374**	(9,687; 23,060)
CAMAQ01	0,329**	97,401**	6,45**	(3,211; 9,689)	0,862 <sup>NS</sup>	(0,355; 1,369)
ARRGR01	0,329**	99,668**	0,0217**	(0,005345; 0,0381)	0,002**	(0,00054; 0,00526)
CACHS50	0,329**	97,621**	4,387**	(-20,424; 29,198)	0,586**	(0,208; 0,964)
MOSTS51	0,329**	9,261**	1369,8**	(994,98; 1744,621)	183,06**	(107,673; 258,447)

$d^{1/}$  Limite superior;  $b^{2/}$  Declividade da curva;  $I_{50}^{4/}$  Dose do herbicida imazethapyr que causa 50% de efeito no fator analisado; Dose  $^{4/}$  Dose em  $g \cdot ha^{-1}$ ; IC  $^{5/}$  95% Intervalo de confiança a 5% de probabilidade; FR  $^{6/}$  fator de resistência =  $I_{50}$  do biótipo avaliado/  $I_{50}$  do biótipo suscetível SUSSP01.

\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; <sup>NS</sup> Não significativo.

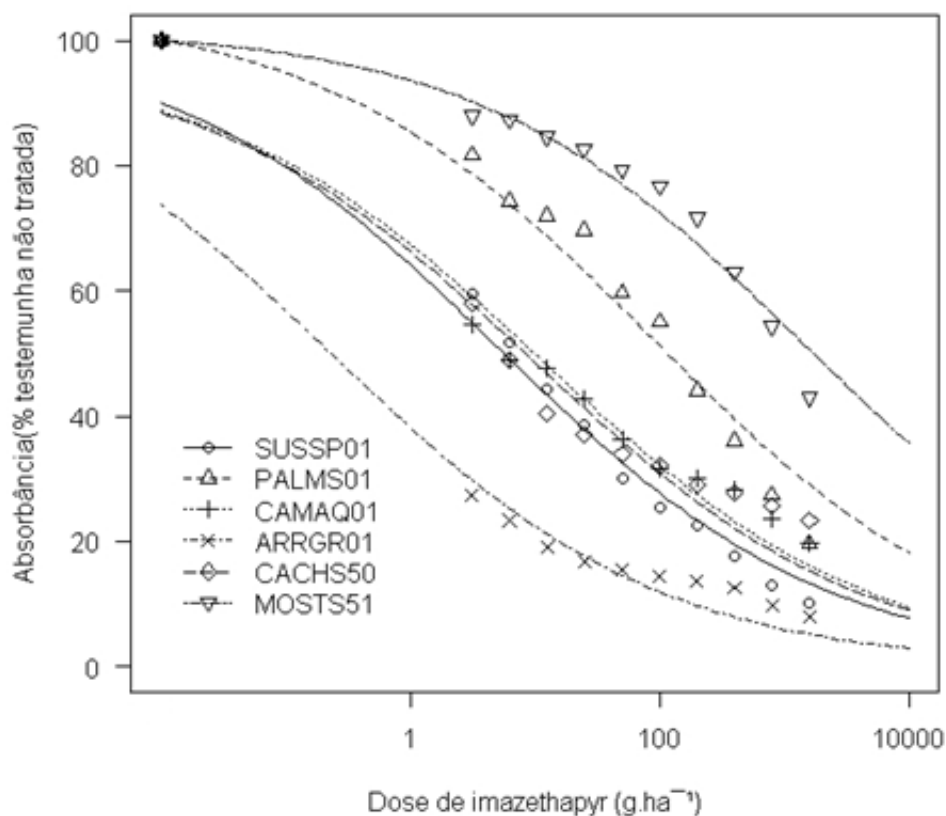


FIGURA 16. Redução da absorvância (%) de seis biótipos de capim-arroz, em relação à testemunha não tratada, em função de diferentes doses do herbicida imazethapyr. Equações correspondentes encontram-se na Tabela 9. Porto Alegre, RS. 2013.

Os resultados da atividade da enzima ALS indicam que as populações PALMS01 e MOSTS51 apresentam resistência devido à insensibilidade da enzima ALS ao herbicida imazethapyr, por apresentar menor redução de sua atividade a doses que seriam letais para as plantas dessa espécie (Figura 16 e Tabela 9). O  $I_{50}$  foi de 86,2 g.ia.ha<sup>-1</sup> para a população PALMS01 e 1525,4 g.ia.ha<sup>-1</sup> para MOSTS51, esses valores são respectivamente 17 e 299 vezes maior que o biótipo suscetível SUSSP01. O fator de resistência foi significativo e correspondeu a 16,3 e 183 (Tabela 9). Em todos os biótipos analisados, o nível de controle aumentou com o incremento da dose do herbicida. Dentre todos, o biótipo MOSTS51 foi o que apresentou o maior nível de resistência, onde, a maior dose utilizada no ensaio, 1600

g.ia.ha<sup>-1</sup>, reduziu a produção de acetolactato em 57% (Figura 16 e Tabela 9). Trabalho realizado com *B. subalternans* apresentou FR de 166 vezes maior para o biótipo resistente quando comparado com o suscetível (Lamego *et al.*, 2009). Em outro trabalho, a atividade da enzima ALS confirmou resistência em *Setaria viridis* indicando um FR de 182 vezes maior para a população resistente (Laplante *et al.*, 2009).

#### 4.2.3 Sequenciamento do gene ALS em capim-arroz

O fragmento sequenciado do gene ALS de *E. crus-galli* apresentou 1701 pb (Riar *et al.*, 2013) e 1870pb (Panozzo *et al.*, 2013). Entretanto, trabalho realizado com a finalidade de sequenciar completamente o gene ALS de *E. phyllopogon* comprovou que o gene ALS dessa espécie contém 2300pb (Iwakani *et al.*, 2011). O gene ALS é composto por seis regiões conservadas, designadas como regiões de domínio CAD para a porção inicial do gene, BE para a parte final e região de domínio F entre essas regiões (Merotto Jr. *et al.*, 2009). Nessas regiões foram identificadas mutações que causam resistência aos herbicidas inibidores da ALS em diversas espécies.

O ensaio *in vivo* da atividade da enzima ALS indicou que uma alteração nessa enzima pode ser a causa de resistência para os biótipos PALMS01 e MOSTS51. Desta forma, visando comprovar que esses biótipos de capim-arroz oriundos do estado do RS apresentam mutação, foi sequenciado o gene ALS de modo a identificar as mutações associadas com a resistência aos herbicidas inibidores da ALS. O sequenciamento do gene ALS, realizado no presente trabalho, foi iniciado com a obtenção dos *primers* (Tabela 3) desenhados com base nas sequências ALS de *Bromus tectorum*, *Echinochloa phyllopogon* e *Oryza sativa*, com a finalidade de amplificar as regiões de domínio AD, F e BE. Esses *primers* foram eficientes na amplificação das sequências nucleotídicas que correspondem



às regiões de domínio AD (Figura 17b), região entre D e F (Figura 17c), F (Figura 17d) e BE (Figura 17e) do gene ALS. Esses *primers* produziram fragmentos únicos a partir dos quais foi possível a purificação do DNA direto da reação de PCR. Os fragmentos purificados foram sequenciados para determinar a sequência nucleotídica do gene ALS. Os *primers* desenhados para amplificação da região de domínio C (Riar *et al.*, 2013) não produziram tamanho de fragmento esperado, não obtendo a sequência da região inicial do gene ALS.

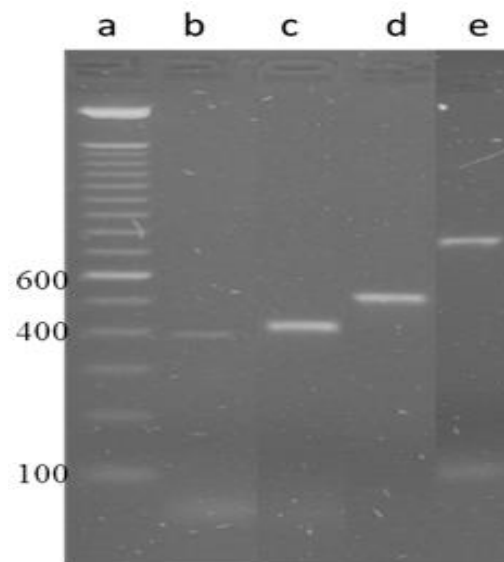


FIGURA 17. Produto representativo da amplificação de todos os biótipos para os domínios AD (b), região entre domínio D e F (c), domínio F (d) e os domínios BE (e) do gene ALS de capim-arroz, separados em gel de agarose 2%, e corados com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100pb (a). Porto Alegre, RS. 2012.

Para comprovar que as sequências obtidas correspondem ao gene ALS, que até o momento de realização deste experimento eram desconhecidas para o capim-arroz, foi realizado alinhamento através do programa BLAST (Basic Local Alignment Source Toll) com as sequências nucleotídicas do gene ALS de outras espécies. As sequências obtidas no presente trabalho apresentaram homologia de 69, 87 e 99% com as espécies *Arabidopsis thaliana* (NM\_114714.2), *O. sativa* (AY 885675.1) e *E. phyllopogon* (AB 636580),

respectivamente. Outro trabalho realizado com *E. crus-galli* apresentou sequência com 98% de similaridade com sequências de Poaceas (Panozzo *et al.*, 2013). Desta forma, os resultados obtidos sugerem que as sequências obtidas são referentes ao gene ALS. A similaridade entre as sequências dos biótipos resistentes e a sequência do biótipo suscetível foi de 100% para as populações CAMAQ01, ARRGR01 e CACHS50 e 99% para as populações PALMS01 e MOSTS51, diferindo apenas as regiões que apresentavam mutações. Esse percentual também foi encontrado em trabalho realizado com *E. crus-galli* (Riar *et al.*, 2013). No alinhamento com as sequências de Arabidopsis (NM\_114714.2) são mostradas as regiões de domínios (C, A, D, F, B e E) do gene ALS e os locais onde se encontram os aminoácidos alterados, que conferem resistência a planta (Apêndice 3), exceto a região de domínio C que não foi obtida.

Não foram identificados polimorfismos entre as sequências do biótipo suscetível SUSSP01 e dos biótipos resistentes CAMAQ01, ARRGR01 e CACHS50. Já, para os biótipos PALMS01 e MOSTS51 foi observado polimorfismo na sequência nucleotídica na região dos domínios E e B, respectivamente. Na população MOSTS51, a mutação referente à região de domínio B sofreu uma substituição na posição central do códon referente ao aminoácido Triptofano ( $W_{574}$ ). Essa substituição foi de uma base nitrogenada Guanina (G) por Timina (T), acarretando em uma substituição do aminoácido Triptofano (TGG) por Leucina (TTG) na região de domínio B (Apêndice 3). Essa alteração pode ser melhor visualizada no alinhamento realizado com a tradução dos pares de base para aminoácidos (Apêndice 4). Na análise do cromatograma pode-se observar que a mutação em questão encontra-se em heterozigose ou corresponde à existência de mais de uma cópia do gene ALS (Figura 18). Essa mutação em heterozigose também foi encontrada em outros biótipos de capim-arroz, onde a substituição da base nitrogenada corresponde à mesma mutação

encontrada nesse trabalho (Kaloumenos *et al.*, 2013; Panozzo *et al.*, 2013). Essa alteração também confere resistência a inibidores da ALS em outras espécies de planta daninha, como *Schoenoplectus juncooides* (Uchino *et al.*, 2007), *Amaranthus tuberculatus* (Patzoldt & Tranel, 2007) e *Bidens subalternans* (Lamego *et al.*, 2009).

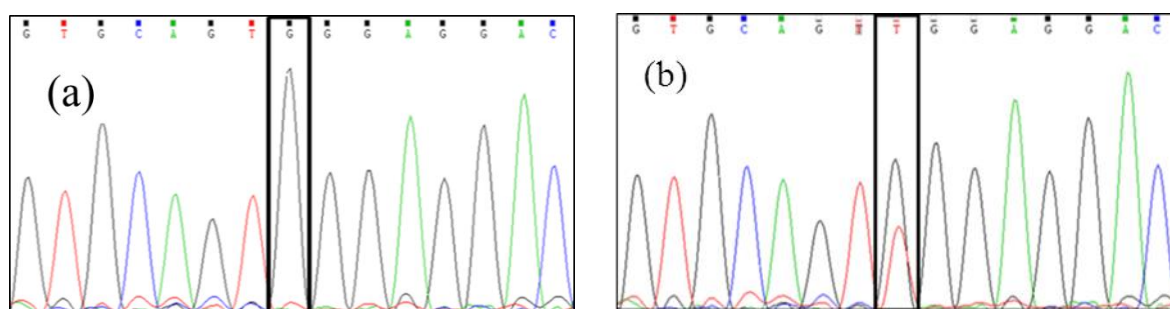


FIGURA 18. Cromatograma do sequenciamento da região B do biótipo suscetível (SUSP01) figura (a) e do biótipo resistente MOSTS51 figura (b). Porto Alegre, RS. 2013.

O elevado número de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, descrito na literatura, que apresentam mutação no aminoácido Trp<sub>574</sub> pode ser explicado pelo fato de que esta mutação confere elevado nível de resistência. De todas as alterações de aminoácido possíveis, a substituição por Leu<sub>574</sub> ocorre na maioria dos casos registrados de resistência. Essa alteração de Triptofano para Leucina, pode conferir resistência cruzada a todos os grupos pertencentes aos herbicidas inibidores da ALS (IMIs, SUs, TPs, PTBs e SCTs) (Heap, 2013). Essa mutação além de ser frequentemente detectada confere alto nível de resistência em diversas plantas daninhas (Lamego *et al.*, 2009; Uchino *et al.*, 2007; Patzoldt & Tranel, 2007) incluindo o capim-arroz (Panozzo *et al.*, 2013).

Como pode ser observado no resultado dos ensaios de dose-resposta e da atividade da enzima ALS, o biótipo MOSTS51, o qual está presente à mutação W<sub>574</sub>L, mostrou ser mais resistente que os demais biótipos testados. O padrão de resistência encontrado nesse

trabalho é muito similar ao observado em outros biótipos de capim-arroz (Panozzo *et al.*, 2013) e em outras espécies que apresentam a mesma mutação (Lamego *et al.*, 2009; Uchino *et al.*, 2007; Patzoldt & Tranel, 2007). No entanto, há populações de capim-arroz que apresentam resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS onde, o mecanismo de resistência é devido à metabolização dos herbicidas pelas enzimas citocromo P450 monooxygenases (Fischer *et al.*, 2000; Kaloumenos *et al.*, 2013; Yasuor *et al.*, 2008; Yasuor *et al.*, 2009). Entretanto, o biótipo MOSTS51 não apresentou resposta aos inibidores das enzimas P450, PBO, ABT e Malathion (Matzenbacher, 2012). Este biótipo comprovou resposta nos ensaios de dose-resposta (Figura 14, 16 e Tabela 8), com menor sensibilidade da enzima ALS do que o biótipo suscetível (Figura 16 e Tabela 9) e apresenta mutação na enzima ALS, relacionada com o mecanismo de resistência ao herbicida imazethapyr (Apêndice 3 e 4). Desta forma, conclui-se que a maior parte da resistência deste biótipo é devido à alteração da enzima alvo, não descartando outros mecanismos de resistência não relacionados à local de ação alterado, evidenciado em experimento com C<sup>14</sup> que comprovou a redução da translocação do herbicida inibidor da ALS em biótipo de capim-arroz resistente quando comparado com suscetível (Riar *et al.*, 2012a).

O outro biótipo PALMS01 que apresentou mutação no gene ALS foi identificado como possuindo uma substituição na posição central do códon referente ao aminoácido Serina (S<sub>653</sub>) na região de domínio E. A mutação ocorrente nesse aminoácido, diferente da mutação no aminoácido Trp<sub>574</sub>, de forma geral, não apresenta altos níveis de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS, porém confere elevado nível de resistência aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das IMIs (Heap, 2013). Mutações na posição S<sub>653</sub> podem resultar nas trocas de S<sub>653</sub>N, S<sub>653</sub>I e S<sub>653</sub>T e essas três alterações resultam em resistência ao herbicida imazethapyr (>10 vezes) em diversas espécies de planta daninha

(Laplante *et al.*, 2009; Patzoldt *et al.*, 2001; Patzoldt *et al.*, 2007; Whaley *et al.*, 2006). A espécie *Amaranthus hybridus* apresentou a mutação S<sub>653</sub>N, que conferiu 10 vezes mais resistência a IMI e PTB e resistência intermediária (<10) a SU e TP (Whaley *et al.*, 2006) e diferentes populações de *Setaria viridis* apresentam as três possíveis alterações de aminoácidos apresentadas anteriormente (Laplante *et al.*, 2009).

A população PALMS01 apresenta mutação que corresponde à substituição de uma base nitrogenada Guanina por uma Adenina, ocasionando uma substituição do aminoácido Serina (S) (AGC) por Asparagina (N) (AAC) (Apêndice 3). Essa alteração pode ser visualizada no alinhamento realizado com a tradução dos pares de base para aminoácidos (Figura 18). Essa mesma mutação foi encontrada em populações de *S. viridis* e proporciona nível de resistência similar ao encontrada nesse experimento (Laplante *et al.*, 2009). De acordo com os resultados obtidos no experimento de dose-resposta (Figura 14, 16 e Tabela 8) e da atividade da enzima ALS (Figura 16 e Tabela 9), o biótipo PALMS01 apresentou moderada resistência ao herbicida imazethapyr. Essa moderada resistência pode ser devido à mutação estar em heterozigose (Figura 19) e a ocorrência de metabolização (Matzenbacher, 2012), como mencionada no item 4.2.1.

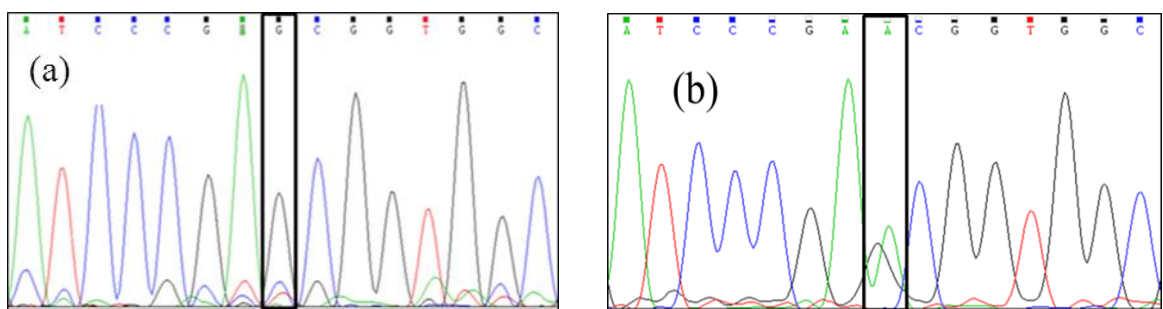


FIGURA 19. Cromatograma do sequenciamento da região E do biótipo suscetível (SUSSP01) figura (a) e do biótipo resistente PALMS01 figura (b). Porto Alegre, RS. 2013.

O biótipo ARRGR01 foi classificado como resistente no ensaio de dose-resposta e foi mais suscetível que o biótipo suscetível SUSP01 (Figura 14, 16 e Tabela 8). Essa resistência poderia ser devido à uma mutação na enzima ALS, porém das regiões de domínio analisadas não foi possível constatar mutação associada com a atividade da enzima ALS (Figura 16 e Tabela 9). Isto exclui a ocorrência de uma possível mutação no aminoácido Ala<sub>122</sub>, descartando esse mecanismo como origem da resistência nesse biótipo. Como discutido anteriormente (Item 4.3.1) o biótipo ARRGR01 apresenta o mecanismo de metabolização como origem da resistência aos herbicidas (Matzenbacher, 2012). Resultado similar foi encontrado em populações de capim-arroz que se mostraram resistentes ao herbicida, porém não apresentaram insensibilidade da enzima no ensaio da atividade da enzima ALS e não foram observados mutações na sequência do gene ALS. Esses resultados evidenciam outro mecanismo como origem da resistência, e os autores sugerem que o mecanismo possa estar relacionado à metabolização do herbicida (Riar *et al.*, 2013).

## 5 CONCLUSÕES

A avaliação morfológica apresentou grande variabilidade tanto de características vegetativas como reprodutivas dificultando a utilização das chaves taxonômicas para vários acessos. O comprimento do eixo secundário foi característico da espécie *E. colonum*, e a largura do antécio foi característica discriminadora de *E. crus-pavonis* em relação a *E. crus-galli*.

A análise filogenética, através de sequências de cpDNA é mais discriminadora em relação aos parâmetros morfológicos do que as sequências ITS. A espécie *E. colonum* apresenta vários indel e mutações possibilitando a fácil diferenciação das demais espécies. A sequência de nucleotídeos de cpDNA, obtida com os marcadores de cpDNA, indicou a ocorrência de duas mutações difenciais entre as espécies *E. crus-galli* e *E. crus-pavonis*. Nestes locais foram encontradas sequências em heterozigose indicando a possibilidade de hibridização entre estas espécies.

A resistência ao herbicida imazethapyr, em populações de capim-arroz, está associada a mutações do gene ALS que indicam a ocorrência de alteração de local de ação como mecanismo de resistência. Este processo em conjunto com a prévia identificação de incremento de metabolização de herbicidas em capim-arroz indica a ocorrência de grande complexidade da resistência a herbicida nesta espécie.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINETTO, D. et al. Interferência de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) na cultura do arroz irrigado (*Oryza sativa*) em função da época de irrigação. **Planta Daninha**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 689-696, 2007.
- AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Bethier, 2009.
- ANDRES, A.; MACHADO, S. L. de O. Plantas daninhas em arroz irrigado. In: MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; GOMES, A. da S. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap. 15, p. 457-546.
- ANDRES, A. et al. Detecção da resistência de capim-arroz (*Echinochloa* sp.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do sul do Brasil. **Planta Daninha**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 221-226, 2007.
- AOKI, D.; YAMAGUCHI, H. Genetic relationship between *Echinochloa crus-galli* and *Echinochloa oryzicola* accessions inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequences. **Weed Biol. Manag.**, Oxford, v. 8, n. 4, Dec., p. 233-242, 2008.
- ASHIGH, J. et al. Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp(376)Glu substitution in *Amaranthus powellii*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, San Diego, v. 95, n. 1, Sep., p. 38-46, 2009.
- BALDWIN B. G. et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, Saint Louis, v. 82, n. 2, p. 247-277, 1995.
- BALTAZAR, A. M.; SMITH, R. J. Propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control in rice (*Oryza sativa*). **Weed Technol.**, Champaign, v. 8, n. 3, p. 576-581, 1994.
- BARRETT, S. C.; WILSON, B. F. Colonizing ability in the *Echinochloa crus-galli* complex (barnyard grass). II Seed Biology. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, n. 61, p. 556-562, 1983.
- BELTRAN, J. C.; PANNELL, D. J.; DOOLE, G. J. Economic implications of herbicide resistance and high labour costs for management of annual barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Philippine rice farming systems. **Crop Protection**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 31-39, 2012.
- BUSO, G. S. C. **Marcadores Moleculares e Análise Filogenética**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. (Documentos, 136).



CAREY, V. F. **Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and bearded sprangletop (*Leptochloa fascicularis*) interference and control in rice (*Oryza sativa*)**. 1990. M.S. thesis - University of Arkansas, Fayetteville, AR, 1990.

CAREY, V. F.; HOAGLAND, R. E.; TALBERT, R. E. Verification and distribution of propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas. **Weed Technol.**, Champaign, v. 9, n. 2, p. 366–372, 1995.

CAREY, V. F.; HOAGLAND, R. E.; TALBERT, R. E. Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass.2. In-vivo metabolism of the propanil molecule. **Pesticide Science**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 333-338, 1997.

CARRETERO, J. L. El genero *Echinochloa* en el Grande Suroeste de Europa. **An. Jard. Bot.**, Madrid, v. 38, n. 1, p. 91–108, 1981.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Londrina, v. 21, n.3, p. 507-515, 2003.

CLEGG, M. T.; ZURAWSKI, G. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny; present status and future prospects. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J. **Molecular systematics of plants**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 1-13.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2013. Brasília: CONAB, 2013.

Disponível em:

<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_01\\_09\\_17\\_44\\_20\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf)>. Acesso em: 1 fev. 2013.

CORBETT, C. A. L.; TARDIF, F. J. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. **Pest Manag. Sci.**, Sussex, v. 62, n. 7, Jul., p. 584-597, 2006.

COTY, B. et al. Development and evaluation of an eSENSOR genotyping test for CYP4502C9 and VKORC1 polymorphisms. **J. Mol. Diagn.**, Maryland, v. 9, n. 5, Nov., p. 660-660, 2007.

DAMALAS, C. A.; DHIMA, K. V.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Morphological and physiological variation among species of the genus *Echinochloa* in northern Greece. **Weed Sci.**, Champaign, v. 56, n. 3, May-Jun., p. 416-423, 2008.

DEVINE, M. D.; EBERLEIN, C. V. Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. In: ROE, R. M; BURTON, J. D.; KUHR, R. J. (Ed.). **Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam: IOS Press, 1997. p. 159-185.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Oklahoma, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

DUGGLEBY, R. G.; PANG, S. S. Acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biochemistry & Molecular Biology**, Singapore, v. 33, n. 1. p. 1-36, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Arroz Irrigado. Plantas Daninhas em Arroz Irrigado: Principais plantas daninhas. [S.l.]: EMBRAPA, 2005. (Sistemas de Produção, 3). Disponível em : <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/ca\\_p11\\_03](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/ca_p11_03)>. - Acesso em: 01 out. 2011

FISCHER, A. J.; GRANADOS, E.; TRUJILLO, D. Propanil resistance in populations of junglerice (*Echinochloa-colona*) in colombian rice fields. **Weed Sci.**, Champaign, v. 41, n. 2, p. 201-206, 1993.

FISCHER, A.; RAMIREZ, H. V.; LOZANO, J. Suppression of junglerice [*Echinochloa colona* (L.) Link] by irrigated rice cultivars in Latin America. **Agron. J.**, Madison, v. 89, n. 3, p. 516-521, 1997

FISCHER, A. J. et al. Mechanisms of resistance to bispyribac-sodium in an *Echinochloa phyllopogon* accession. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 68, n. 3, p. 156-165, 2000.

FLECK, N. G. et al. Interferência de plantas concorrentes em arroz irrigado modificada por métodos culturais. **Planta Daninha**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 19-28, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Global cereal supply and demand brief. **Crop Prospects and Food Situation**, n. 4, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai473e/ai473e04.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Information update as of 31 october 2012. **Rice Market Monitor**, v. 15, n. 4, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/ap772e/ap772e.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2013.

GAINES, T. A. et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GALON, L. et.al. Estimativa das perdas de produtividade de grãos em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) pela interferência do capim-arroz (*Echinochloa* spp.). **Planta Daninha**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 697-707, 2007.

GERWICH, B. C.; MIRELES, L. C.; EILERS, R. J. Rapid diagnosis of ALS AHAS-resistant weeds. **Weed Technology**, Champaign, v. 7, n. 2, p. 519-524, 1993.

GIANNOPOLITIS, C. N., VASSILIOU, G. Propanil tolerance in *Echinochloa crus-galli* (L) Beauv. **Trop. Pest Manag.**, London, v. 35, n. 1, p. 6-7, 1989.

GUILLEMIN J. P. et al. Assessing potential germination period of weeds with base temperatures and base water potentials. **Weed Research**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 76-87, 2012.

GRESSEL, J. **Molecular biology of weed control**. London/New York: Taylor & Francis, 2002. 528 p.

HAIDER, N. Chloroplast-specific universal *primers* and their uses in plant studies. **Biologia Plantaru**. Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 225-236, 2011.

HAN, H. P. et al. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Manag. Sci.**, Sussex, v. 68, n. 8, Aug., p. 1164-1170, 2012.

HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 10 set. 2011.

HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>>. Acesso em: 30 abr. 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, Calif.: College of Agriculture, 1950. 347p.

HOAGLAND, R. E. et al. Metabolically based resistance to the herbicide propanil in *Echinochloa* species. **Weed Science**, Lawrence, v. 52, n. 3, p. 475-486, 2004.

HOLM, L. G. et al. **The World's Worst Weeds**. Honolulu: HI: University Press of Hawaii, 1977. 1129 p.

IWAKAMI, S. et al. Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. **Pest Manag. Sci.**, Sussex, v. 68, n. 7, Jul., p. 1098-1106, 2012.

KALOUMENOS, N. S. et al. Target-site mutation associated with cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing.). **Pest Manag. Sci.**, Sussex, v. 69, n. 7, Jul., p. 865-873, 2013.

KISSMANN, K. G. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira S.A, Indústria Química, 1991. p. 390-404.

KITA, Y.; ITO, M. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphism in individual plants. **Plant Syst. Evol.**, Vienna, v. 225, n. 1-4, p. 1-13, 2000.

KUK, Y. I. et al. Rapid diagnosis of resistance to sulfonylurea herbicides in monochoria (*Monochoria vaginalis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 51, n. 3, p. 305-311, 2003.

LAMEGO, F. P. **Elucidação do mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS na espécie poliplóide *Bidens subalternans* DC.** 2008. 152 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LAMEGO, F. P. et al. Molecular Basis of Resistance to ALS-Inhibitor Herbicides in Greater Beggarticks. **Weed Sci.**, Champaign, v. 57, n. 5, Sep.-Oct., p. 474-481, 2009.

LAPLANTE, J.; RAJCAN, I.; TARDIF, F. J. Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. **Theor. Appl. Genet.**, New York, v. 119, n. 4, Aug., p. 577-585, 2009.

LEAH, J. M. et al. Association between elevated activity of aryl acylamidase and propanil resistance in jungle-rice, *Echinochloa colona*. **Pestic. Sci.**, Sussex, v. 42, n. 4, Dec., p. 281-289, 1994.

LEAH, J. M. et al. Effect of mono-oxygenase inhibitors on uptake, metabolism and phytotoxicity of propanil in resistant biotypes of jungle-rice, *Echinochloa colona*. **Pesticide Science**, Sussex, v. 49, n. 2, p. 141-147, 1997.

LOPEZ-MARTINEZ, N.; MARSHALL, G.; DEPRADO, R. Resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to atrazine and quinclorac. **Pesticide Science**, Sussex, v. 51, n. 2, p. 171-175, 1997.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F. et al. Alternativas de manejo químico da planta daninha *Digitaria ciliaris* resistente aos herbicidas inibidores da ACCase na cultura de soja. **Planta Daninha**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 407-414, 2006.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARAMBE, B.; SAMITA, S. Propanil resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) and use of herbicides with alternative modes of action for their control in Sri Lanka. **Z. Pflanzenk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot.**, Stuttgart, v. 18, p. 967-972, 2002.

MARIOT, C. H. P.; MENEZES, V. G.; SOUZA, P. A. Resistência múltipla e cruzada de capim-arroz aos herbicidas na cultura de arroz no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 1455-1459.

MASSA, D., KRENZ, B.; GERHARDS, R. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. **Weed Res.**, Malden, v. 51, n. 3, Jun., p. 294-303, 2011.

- MATZENBACHER, F. **Caracterização e controle de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas e quinclorac em arroz irrigado**. 2012. 212 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia com ênfase em Herbologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2012.
- MAUN, M. A.; BARNETT, S. C. H. The biology of Canadian weeds: 77. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. **Can. J. Plant Sci.**, Ottawa, v. 66, n. 3, p. 739–759, 1986.
- MELO, P. T. B. S. et al. Fluxo de emergência de plantas daninhas em áreas de cultivo de arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro. **Anais..** Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004. 1 CD-ROM.
- MENEZES, V. G.; RAMIREZ, H. V. Resistance *Echinochloa crus-galli* L. to quinclorac in flooded Rice in southern Brasil. In: INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, 3., 2000, Foz do Iguaçu. **Abstracts...** Corvallis: IWSC, 2000. p. 140.
- MENEZES, V. G.; RAMIREZ, H. V.; OLIVEIRA, J. C. Resistance of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. to quinclorac in flooded rice in southern Brazil. In: INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, 3., 2000, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Foz do Iguaçu: [s.n.], 2000.
- MENNAN, H.; KAYA-ALTOP, E. Molecular Techniques for Discrimination of Late Watergrass (*Echinochloa oryzicola*) and Early Watergrass (*Echinochloa oryzoides*) Species in Turkish Rice Production. **Weed Sci.**, Champagn, v. 60, n. 4, Oct.-Dec., p. 525-530, 2012.
- MENNAN, H. et al. Competitiveness of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars against *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. in water-seeded production systems. **Crop Prot.**, Oxon, v. 41, Nov., p. 1-9, 2012.
- MEROTTO JUNIOR, A. et al. Resistência de *Echinochloa sp.* à quinclorac. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 22., 2000, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Londrina: SBCPD, 2000. p. 513.
- MEROTTO JUNIOR, A. et al. Resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Palotti, 2009. p. 312-315.
- MICHAEL, J. C. et al. Target-site resistance to acetolactate synthase in wild mustard (*Sinapis arvensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 54, n. 2, p. 191-197, 2006.
- MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de Identificação de Plantas Infestantes - Cultura do Arroz**. Campinas: Editora FMC, 2010. p. 854.

- NOLDIN, J. A. et al. Capim-arroz com resistência múltipla aos herbicidas em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Palotti, 2009. p. 308-311.
- NORRIS, R. F. Echinochloa crus-galli (barnyardgrass) seed rain under irrigated conditions. In: BEKKER, R. M. et al. (Ed.). **Aspects of Applied Biology**. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists, 2003. p. 163–170.
- NORSWORTHY, J. K. et al. Consultant perspectives on weed management needs in Arkansas rice. **Weed Technol.**, Lawrence, v. 21, n. 3, Jul.-Sep., p. 832-839, 2007.
- OERKE, E. C.; DEHNE, H. –W. Safeguarding production – losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 4, p. 275-285, 2004.
- OERKE, E. C. Crop losses to pests. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v. 144, Feb., p. 31-43, 2006.
- OSUNA, M. D. et al. Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in Echinochloa phyllopogon and Cyperus difformis. **Pestic. Biochem. Physiol.**, San Diego, v. 73, n. 1, May, p. 9-17, 2002.
- OSUNA, M. D. et al. Genetic Diversity and Spread of Thiobencarb Resistant Early Watergrass (Echinochloa oryzoides) in California. **Weed Sci.**, Champagn, v. 59, n. 2, Apr-Jun., p. 195-201, 2011.
- OTTO, S. P. In polyploids, one plus one does not equal two. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 431-433, 2003.
- PANOZZO, S. et al. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species Echinochloa crus-galli. **Pestic. Biochem. Physiol.**, San Diego, v. 105, n. 2, Feb., p. 93-101, 2013.
- PATZOLDT, W. L. et al. A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. **Weed Sci.**, Champagn, v. 49, n. 4, Jul.-Aug., p. 485-490, 2001.
- PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J. Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (Amaranthus tuberculatus). **Weed Sci.**, Champagn, v. 55, n. 5, Sep.-Oct., p. 421-428, 2007.
- PIGNATTI, S. **Flora d'Italia**. Bologna: Ed. Agricole, 1982. p. 2324. v. 3 p. 2324.
- PIROLA, A. Appunti per il riconoscimento delle Echinocloe italiane (Giavone). **Il Riso**, n. 14, p. 607-609. 1965.
- PIRIE, M. D. et al. Ancient paralogy in the CPDNA trnL-F region in Annonaceae: Implications for plant molecular systematics. **Am. J. Bot.**, St. Louis, v. 94, n. 6, Jun., p. 1003-1016, 2007.

- PFITSCHER, E. M.; BARRETO, I. L. As espécies do gênero *Echinochloa* (Graminae) ocorrentes no Rio Grande do Sul. **Anuário Técnico do IPZFO**, Porto Alegre – RS, v. 3, p. 245-289, Jul., 1976.
- POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 2, p. 317-47, 2010.
- RAJGURU, S. N. et al. Mutations in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 6, p. 946-946, 2005.
- RAY, T. B. Site of action of chlorosulfuron. **Plant Phys.**, Rockville, v. 75, p. 827-831, 1984.
- RIAR, D. S. et al. Resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **International Journal of Agronomy**, v. 2012, 2012,
- RIAR, D. S. et al. Physiological and Molecular Basis of Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicide Resistance in Barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*). **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v. 61, n. 2, Jan., p. 278-289, 2013.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **J. Stat. Software**, v. 12, n. 5, p. 1-22, 2005.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. New York: Exeter Software, 1990.
- RUIZ-SANTAELLA, J. P. et al. Resistance mechanisms to cyhalofop-butyl in a biotype of *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. from California. **J. Plant Dis. Prot.**, Stuttgart, v. 121, p. 95-100, 2006.
- SATHASIVAN, K. et al. Nucleotide-sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis-thaliana* var *columbia*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 18, n. 8, Apr., p. 2188-2188, 1990.
- SEEFELDT, S. S. *et al.* Production of herbicide-resistant jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) x wheat (*Triticum aestivum*) hybrids in the field by natural hybridization. **Weed Science**, Champaign, v. 46, n. 6, p. 632-634, 1998.
- SHANER, D. L. Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection and management. **Weed Science**, Champaign, v. 44, n. 3, p. 405-411, 1999.
- SHOULIANG, C.; PHILLIPS, S. M. Allotetraploid. **Flora of China**, v. 22, p. 519-520, 2006.

SIMINSZKY, B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 5, n. 2-3, p. 445-458, 2006.

SPARACINO, A. C., A. et al. Morphological analysis of the main *Echinochloa* species in Italian rice fields. In: EUROPEAN WEED RESEARCH SOCIETY. MEDITERRANEAN SYMPOSIUM ON WEED CONTROL IN SUSTAINABLE AGRICULTURE IN THE MEDITERRANEAN AREA, 5., 1994, Perugia, Italy. **Proceedings...** Perugia, Italy: [s.n.], 1994. p. 285-292.

TABACCHI, M. et al. Morphological traits and molecular markers for classification of *Echinochloa* species from Italian rice fields. **Weed Sci.**, Lawrence, v. 54, n. 6, Nov.-Dec., p. 1086-1093, 2006.

TABERLET P. et al. Universal *primers* for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Mol Biol.**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 1105–1109, 1991.

TASRIF A., et al. Morphological variation of the ecotypes of *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* (L.) Beauv (barnyardgrass : Poaceae) in Malaysia and Indonesia. **Biotropia, SEA Journal of Biology**, n. 22, p. 1-14, 2004.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Champaign, v. 50, n. 6, p. 700-712, 2002.

TSUJI, R. et al. Herbicide-resistant late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): similarity in morphological and amplified fragment length polymorphism traits. **Weed Sci.**, Champaign, v. 51, n. 5, Sep.-Oct., p. 740-747, 2003.

UCHINO, A. et al. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea – resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. **Weed biology and Management**, Oxon, v. 7, n. 2, p. 89-96, 2007.

ULGUIM, A. da R. et al. Ocorrência de capim-arroz (*Echinochloa colonun* (L.) Link) resistentes aos herbicidas inibidores de ALS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: CBCPD, 2010. 1 CD-ROM.

UTANO, A. et al. A barnyard grass mimic to rice plant belongs to *Echinochloa oryzicola*, which is clearly distinguished from related taxa based on RAPD analysis. In: APWSS Conference, 17., 1999, Bangkok. **Proceedings...** Bangkok: The Asian-Pacific Weed Science Society, 1999.

VIDAL, R. A.; MEROTTO JUNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152 p.

VIDOTTO, F. et al. Herbicide sensitivity of *Echinochloa* spp. accessions in Italian rice fields. **Crop Prot.**, Oxon, v. 26, n. 3, p. 285-293, 2007.



- WANGKUMHANG, P. et al. Wasp: a web-based allele-specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 1, p. 275-283, 2007.
- WARWICK, S. I.; WEAVER, S. E. Atrazine resistance in *Amaranthus retroflexus* (redroot pigweed) and *Amaranthus powellii* (green pigweed) from southern Ontario. **Can. J. Plant Sci.**, Ottawa, v. 60, n. 4, p. 1485-1488, 1980.
- WESTERFELD, W. W. A colorimetric determination of blood acetoin. **J. Biol. Chem.**, Boston, v. 161, n. 2, p. 495-502, 1945. WHALEY, C. A.; WILSON, H. P.; WESTWOOD, J. H. ALS resistance in several smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) biotypes. **Weed Sci.**, Champaign, v. 54, n. 5, Sep.-Oct., p. 828-832, 2006.
- WHALEY, C. M.; WILSON, H. P.; WESTWOOD, J. H. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 55, n. 2, p. 83-90, 2007.
- YABUNO, T. Cytotaxonomic studies on 2 cultivated species and wild relatives in genus *Echinochloa*. **Cytologia (Tokyo)**, Tokyo, v. 27, n. 3, p. 296-305, 1962.
- YABUNO, T. Biosystematic study of genus *Echinochloa*. **Japanese Journal of Botany**, Tokyo, v. 19, n. 2, p. 277-323, 1966.
- YABUNO, T. A biosystematic study on *Echinochloa-oryzoides* (ard) fritsch. **Cytologia (Tokyo)**, Tokyo, v. 49, n. 3, p. 673-678, 1984.
- YAMASUE, Y. Biometric analysis of *Echinochloa* weed complex. In: ASIAN-PACIFIC WEED SCIENCE SOCIETY CONFERENCE, 16., 1997, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: MPPS, 1997. p. 233-237.
- YAMASUE, Y. Strategy of *Echinochloa oryzicola* Vasing for survival in flooded rice. **Weed Biol. Manag.**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 28-36. 2001
- YAMAGUCHI, H. et al. A molecular phylogeny of wild and cultivated *Echinochloa* in East Asia inferred from non-coding region sequences of trnT-L-F. **Weed Biol. Manag.**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 210-218, 2005.
- YANG, Y. W. et al. A study of the phylogeny of *Brassica rapa*, *B-nigra*, *Raphanus sativus*, and their related genera using noncoding regions of chloroplast DNA. **Mol. Phylogenet. Evol.**, Detroit, v. 23, n. 2, May, p. 268-275, 2002.
- YASUDA, K. et al. Molecular identification of *Echinochloa oryzicola* Vasing. and *E. crus-galli* (L.) Beauv. using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique. **Weed Biol Manag.**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2002.
- YASUOR, H. et al. Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. **Pest Manag. Sci.** Sussex, v. 64, n. 10, Oct., p. 1031-1039, 2008.

YASUOR, H. et al. Mechanism of Resistance to Penoxsulam in Late Watergrass *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v. 57, n. 9, May, p. 3653-3660, 2009.

YASUOR, H. et al. Differential Oxidative Metabolism and 5-Ketocloromazone Accumulation Are Involved in *Echinochloa phyllopogon* Resistance to Clomazone. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 153, n. 1, May, p. 319-326, 2010.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART, C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

YUN, M. S. et al. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 83, n. 2-3, p. 107-114, 2005.

## 7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Análises de variância do ensaio de curvas dose-resposta para o herbicida imazethapyr.

### Controle 7 DAA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Dose	8	607,908951	151,51	<0,001
Biótipo	5	143,487654	35,76	<0,001
Dose x Biótipo	40	8,41821	2,1	<0,001
Resíduo	108	4,012346		0,0014

### Controle 14 DAA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Dose	8	18779,8611	1294,61	<0,001
Biótipo	5	8041,0185	554,32	<0,001
Dose x Biótipo	40	412,5463	28,44	<0,001
Resíduo	108	14,5062		<0,001

### Controle 21 DAA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Dose	8	17338,0015	1248,34	<0,001
Biótipo	5	16516,9136	1189,22	<0,001
Dose x Biótipo	40	1026,1597	73,88	<0,001
Resíduo	108	13,8889		<0,001

### Controle 23 DAA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Dose	8	16637,6543	1767,41	<0,001
Biótipo	5	17876,1728	1898,98	<0,001
Dose x Biótipo	40	1198,9506	127,36	<0,001
Resíduo	108	9,4136		<0,001

Continuação APÊNDICE 1. Análises de variância do ensaio de curvas dose-resposta para o herbicida imazethapyr.

Massa seca da parte aérea 23 DAA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Dose	8	14990,8298	1332,85	<0,001
Biótipo	5	14661,9524	1303,61	<0,001
Dose x Biótipo	40	929,9913	82,69	<0,001
Resíduo	108	11,2472		<0,001

continuação

APÊNDICE 2. Análises de variância do ensaio da atividade da enzima ALS para o herbicida imazethapyr.

Atividade da enzima ALS

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Dose	5	10726,16566	1417,74	<0,001
Biótipo	10	8503,28182	1123,93	<0,001
Dose x Biótipo	50	216,27455	28,59	<0,001
Resíduo	132	998,6667	7,5657	<0,001

APÊNDICE 3. Alinhamento das sequências obtidas das populações de capim-arroz, com o gene ALS de *A. thaliana* (NM\_114714.2). Em destaque, sublinhado as regiões de domínio do gene, grafados em amarelo está à trinca nucleotídica que corresponde ao aminoácido que está acima da sequência, com sua respectiva posição e, grafados em vermelho os aminoácidos que sofreram mutação. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

ArabidopsisNM_114714.2  GGATACGCTCGATCCTCAGGTAACCAGGTATCTGTATAGCCACTTCAGG  545
SUSSP01                -----TACGCGCTCGTACGGCTACGTAGGCGTCTGCGTCGCCACCTAGGG  61
CACHS50                CTAGTAGCGCGCTCGTCCGGGACGTCCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCGGG  75
CAMAQ01                G--TTCACGCGCTCGACCCGGCCACGTAGGCGTCTGCGTCGCCACCTCGGG  80
MOSTS51                GGGTTCGCGCGCTCGTCCGGCCGGTCCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCGGG  80
ARRGR01                CGGTTTACTCGCTCGCCCGGCCACGTACGCGTCTGCTTCGACTCCTCGGG  70
PALMS01                -----GCATCCATCTGGTGGTGTATGCGTCTGCGTATTATCCTCGGG  57
                        * . * . ** . . * .**** * . .:* *..**
    
```

```

ArabidopsisNM_114714.2  TCCCGGAGCTACAAATCTCGTTAGCGGATTAGCCGATGCGTGTAGATA  595
SUSSP01                CCCC GG TGCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACT  111
CACHS50                CCCC GG GACACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCCGACTCGTGTCTCGACT  125
CAMAQ01                CCCC GG GCGCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTACTCGACT  130
MOSTS51                CCCC GG GCGCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACT  130
ARRGR01                CCCC GG GCGCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCCGACGGGCTGCTCGACT  120
PALMS01                CCCC GG GCGCACCTACCTCGTCTCCTCGCTCGCCGATGGCTGCTCGACT  107
                        ***** * . **.:* ***** : * . *..***** * * . *..** :
    
```

**DOMÍNIO A P<sub>197</sub>**

```

ArabidopsisNM_114714.2  GTGTTCTCTTGTAGCAATCACAGGACAAGTCCCGTCGTCTATGATTGGT  645
SUSSP01                CCATCCCATATGGTCCGCATCACCGGCCAGGTGCCCGCCGCATGATCGGC  161
CACHS50                CCATCCCATATGGTCCGCATCACCGGCCAGGTGCCCGCCGCATGATCGGC  175
CAMAQ01                CCATCCCATATGGTCCGCATCACCGGCCAGGTGCCCGCCGCATGATCGGC  180
MOSTS51                CCATCCCATATGGTCCGCATCACCGGCCAGGTGCCCGCCGCATGATCGGC  180
ARRGR01                CCATCCCATATGGCCGCATCACCGGCCAAGTGCCCGCCGCATGATCGGC  170
PALMS01                CCATCCCATATGGTCCGCATCACCGGCCAGGTGCCCGCCGCATGATCGGC  157
                        . * ** . * * .**..*****.***.*** ** ** * * ** * * * *
    
```

**A<sub>205</sub> DOMÍNIO D**

```

ArabidopsisNM_114714.2  ACAGATGCGTTTCAAGAGACTCCGATTGTTGAGGTAACGCGTTCGATTAC  695
SUSSP01                ACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTACCCCGTCCATCAC  211
CACHS50                ACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTACCCCGTCCATCAC  225
CAMAQ01                ACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTACCCCGTCCATCAC  230
MOSTS51                ACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTACCCCGTCAATCAC  230
ARRGR01                ACCGACGCCTTCCAAGAGACGCCAATCGTCGAGGTACCCCGTCCATCAC  220
PALMS01                ACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTACCCCGTCCATCAC  207
                        ** . ** * * * * * .***** * . ** * * ***** . ** * * * * *
    
```

```

ArabidopsisNM_114714.2  GAAGCATAACTATCTTGTGATGGATGTTGAAGATATCCCTAGGATTATTG  745
SUSSP01                CAAGCACAACCTACCTCGTCTCGACATCGACGACATCCCCCGGTCATAC  261
CACHS50                CAAGCACAACCTACCTCGTCTCGACATCGACGACATCCCCCGGTCATAC  275
CAMAQ01                CAAGCACAACCTACCTCGTCTCGACATCGACGACATCCCCCGGTCATAC  280
MOSTS51                CAAGCACAACCTACCTCGTCTCGACATCGACGACATCCCCCGGTCATAC  280
ARRGR01                CAAGCACAACCTACCTCGTCTCGACATCGACGACATCCCCCGGTCATAC  270
PALMS01                CAAGCACAACCTACCTCGTCTCGACATCGACGACATCCCCCGGTCATAC  257
                        ***** ***** * * * * . * * * . * * * .***** . * . * ** :
    
```

```

ArabidopsisNM_114714.2  AGGAGCCTTCTTTTCTAGCTACTTCTGGTAGACCTGGACCTGTTTTGGTT  795
SUSSP01                AGGAGGCCTTCTTCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCCGGGCCGGTGCTCGTC  311
CACHS50                AGGAGGCCTTCTTCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCCGGGCCGGTGCTCGTC  325
CAMAQ01                AGGAGGCCTTCTTCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCCGGGCCGGTGCTCGTC  330
MOSTS51                AGGAGGCCTTCTTCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCCGGGCCGGTGCTCGTC  330
ARRGR01                AGGAGGCCTTCTTCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCCGGGCCGGTGCTCGTC  320
PALMS01                AGGAGGCCTTCTTCTCGCCTCCTCTGGCCGGCCCGGGCCGGTGCTCGTC  307
                        **** . ** ***** * . ** : * ***** . * . ** * * * * *
    
```

Continuação APÊNDICE 3. Alinhamento das sequências obtidas das populações de capim-arroz, com o gene ALS de *A. thaliana* (NM\_114714.2). Em destaque, sublinhado as regiões de domínio do gene, grafados em amarelo está à trinca nucleotídica que corresponde ao aminoácido que está acima da sequência, com sua respectiva posição e, grafados em vermelho os aminoácidos que sofreram mutação. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

ArabidopsisNM_114714.2      GATGTTCTTAAAGATATTCAACAACAGCTTGGATTCTTAATTGGGAACA 845
SUSSP01                    GACATCCCCAAGGACATCCAACAGCAGATGGCC--TTGCCGGTCTGGAACA 360
CACHS50                    GACATCCCCAAGGACATCCAACAGCAGATGGCG-CTTATAGTCAGGTACA 374
CAMAQ01                    GACATCCCCAAGGACATCCAACAGCAGATG-----GC- 362
MOSTS51                    AACATCCCCAAGGACATCCAACAGCAGAAGGA---TTAAGGTATGGTGCG 377
ARRGR01                    GACATCCCCAAGGACATCCAACAGCAGATGGCTGTTTCCGTCATGTTACA 370
PALMS01                    GACATCCCCAAGGACATCCAACAGCAGATGGG--TTGGCGTCTG-TTTG 353
.*.* ** **.* ** ** **.* **.* **.* :

ArabidopsisNM_114714.2      GGCTATGAGATTACCTG--GTTATATGTCTAGGATGCCTAAACCTCCGGA 893
SUSSP01                    CGCCCATGACTCTGCCG-GGGTACATTGCGCGCCTGCCAAGCCTCCGGC 409
CACHS50                    TCTTATATACTCCGCCATGGGTACATTGCGCGCCTGCCAAGCCTCCGGC 424
CAMAQ01                    -----TCCGCCG-GGGTACATTGCGCGCCTGCCAAGCCTCCGGC 401
MOSTS51                    A-TTATATAGTGCGCCG-GGGTACATTGCGCGCCTGCCAAGCCTCCGGC 425
ARRGR01                    CCTTGTATACTCCGCCG-GGGTACATTGCGCGCCTGCCAAGCCTCCGGC 419
PALMS01                    CACTAATGTCTCCACCG-GGGTACATTGCGCGCCTGCCAATACCTCCGGC 402
* * . * ** * * * . * . ** * * : . ** * * * .

ArabidopsisNM_114714.2      AGATTCTCATTGGAGCAGATTGTTAGGTTGATTCTGAGTCTAAGAAGC 943
SUSSP01                    AACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTGTTGGTGAGTCGCGGCGCC 459
CACHS50                    AACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTGTTGGTGAGTCGCGGCGCC 474
CAMAQ01                    AACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTGTTGGTGAGTCGCGGCGCC 451
MOSTS51                    AACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTGTTGGTGAGTCGCGGCGCC 475
ARRGR01                    AACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTGTTGGTGAGTCGCGGCGCC 469
PALMS01                    AACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTGTTGGTGAGTCGCGGCGCC 452
*..* .. : * ** **.* * * . * * . ** * ** ** ..*.. *

ArabidopsisNM_114714.2      CTGTGTTGATGTTGGTGGTGGTGGTTTGAATTCTAGCGATGAATTGGGT 993
SUSSP01                    CTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 509
CACHS50                    CTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGC 524
CAMAQ01                    CTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGC 501
MOSTS51                    CTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGC 525
ARRGR01                    CTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGC 519
PALMS01                    CTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGC 502
*** * ** **.* ** **.* ** **.* ** **.* ** **.*

ArabidopsisNM_114714.2      AGGTTTGTGAGCTTACGGGGATCCCTGTTGCGAGTACGTTGATGGGGCT 1043
SUSSP01                    CGCTTTGTGGAGATGACCGGAATCCCAGTGACAACACTACTCTGATGGGCCT 559
CACHS50                    CGCTTTGTGGAGATGACCGGAATCCCAGTGACAACACTACTCTGATGGGCCT 574
CAMAQ01                    CGCTTTGTGGAGATGACCGGAATCCCAGTGACAACACTACTCTGATGGGCCT 551
MOSTS51                    CGCTTTGTGGAGATGACCGGAATCCCAGTGACAACACTACTCTGATGGGCCT 575
ARRGR01                    CGCTTTGTGGAGATGACCGGAATCCCAGTGACAACACTACTCTGATGGGCCT 569
PALMS01                    CGCTTTGTGGAGATGACCGGAATCCCAGTGACAACACTACTCTGATGGGCCT 552
.* ** **.* ** **.* ** **.* ** **.* ** **.* ** **.* **

ArabidopsisNM_114714.2      GGGATCTTATCCTTGTGATGATGAGTTGTCGTTACATATGCTTGAATGC 1093
SUSSP01                    TGGCAACTTCCCCAGTGATGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGC 609
CACHS50                    TGGCAACTTCCCCAGTGATGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGC 624
CAMAQ01                    TGGCAACTTCCCCAGTGATGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGC 601
MOSTS51                    TGGCAACTTCCCCAGTGATGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGC 625
ARRGR01                    TGGCAACTTCCCCAGTGATGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGC 619
PALMS01                    TGGCAACTTCCCCAGTGATGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGC 602
**..* : ** : ** **.* ** **.* ** **.* ** **.* ** **.* **

```

Continuação APÊNDICE 3. Alinhamento das sequências obtidas das populações de capim-arroz, com o gene ALS de *A. thaliana* (NM\_114714.2). Em destaque, sublinhado as regiões de domínio do gene, grafados em amarelo está à trinca nucleotídica que corresponde ao aminoácido que está acima da sequência, com sua respectiva posição e, grafados em vermelho os aminoácidos que sofreram mutação. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

ArabidopsisNM_114714.2   ATGGGACTGTGTATGCAAATTACGCTGTGGAGCATAGTGATTTGTTGTTG 1143
SUSSP01                 ACGGTACTGTATATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCCGACCTGTTGCTG 659
CACHS50                 ACGGTACTGTATATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCCGACCTGTTGCTG 674
CAMAQ01                 ACGGTACTGTATATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCCGACCTGTTGCTG 651
MOSTS51                 ACGGTACTGTATATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCCGACCTGTTGCTG 675
ARRGR01                 ACGGTACTGTATATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCCGACCTGTTGCTG 669
PALMS01                 ACGGTACTGTATATGCAAATTATGCAGTGGATAAAGGCCGACCTGTTGCTG 652
* * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

DOMÍNIO F                      D<sub>376</sub> R<sub>377</sub>

```

ArabidopsisNM_114714.2   GCGTTTGGGGTAAGGTTTGGATGATCGTGTCACGGGTAAGCTTGAGGCTTT 1193
SUSSP01                 GCATTTGGTGTGCGGTTTCGATGATCGTGTGACAGGAAAAATTGAGGCTTT 709
CACHS50                 GCATTTGGTGTGCGGTTTCGATGATCGTGTGACAGGAAAAATTGAGGCTTT 724
CAMAQ01                 GCATTTGGTGTGCGGTTTCGATGATCGTGTGACAGGAAAAATTGAGGCTTT 701
MOSTS51                 GCATTTGGTGTGCGGTTTCGATGATCGTGTGACAGGAAAAATTGAGGCTTT 725
ARRGR01                 GCATTTGGTGTGCGGTTTCGATGATCGTGTGACAGGAAAAATTGAGGCTTT 719
PALMS01                 GCATTTGGTGTGCGGTTTCGATGATCGTGTGACAGGAAAAATTGAGGCTTT 702
* . * * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

ArabidopsisNM_114714.2   TGCTAGTAGGGCTAAGATTGTTTCATATTGATATTGACTCGGCTGAGATTG 1243
SUSSP01                 TGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCAGCTGAGATTG 759
CACHS50                 TGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCAGCTGAGATTG 774
CAMAQ01                 TGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCAGCTGAGATTG 751
MOSTS51                 TGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCAGCTGAGATTG 775
ARRGR01                 TGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCAGCTGAGATTG 769
PALMS01                 TGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCAGCTGAGATTG 752
* * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

ArabidopsisNM_114714.2   GGAAGAATAAGACTCCTCATGTGTCTGTGTGTTGATGTTAAGCTGGCT 1293
SUSSP01                 GCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCGGATGTCAAGCTTGCT 809
CACHS50                 GCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCGGATGTCAAGCTTGCT 824
CAMAQ01                 GCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCGGATGTCAAGCTTGCT 801
MOSTS51                 GCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCGGATGTCAAGCTTGCT 825
ARRGR01                 GCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCGGATGTCAAGCTTGCT 819
PALMS01                 GCAAGAACAAGCAGCCACATGTGTCCATCTGTGCGGATGTCAAGCTTGCT 802
* * * * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

ArabidopsisNM_114714.2   TTGCAAGGGATGAATAAGGTTCTTGAGAACCAGCGGAGGAGCTTAAGCT 1343
SUSSP01                 TTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAATCATATCAAAGAAGAGTTT 859
CACHS50                 TTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAATCATATCAAAGAAGAGTTT 874
CAMAQ01                 TTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAATCATATCAAAGAAGAGTTT 851
MOSTS51                 TTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAATCATATCAAAGAAGAGTTT 875
ARRGR01                 TTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAATCATATCAAAGAAGAGTTT 869
PALMS01                 TTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAATCATATCAAAGAAGAGTTT 852
* * * * * . * * * * * . . * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

ArabidopsisNM_114714.2   TGATTTTGGAGTTTGGAGGAATGAGTTGACGTACAGAAACAGAAGTTTC 1393
SUSSP01                 TGACTTTGGCTCATGGCAAGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATTCC 909
CACHS50                 TGACTTTGGCTCATGGCAGGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATTCC 924
CAMAQ01                 TGACTTTGGCTCATGGCACGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATTCC 901
MOSTS51                 TGACTTTGGCTCATGGCACGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATTCC 925
ARRGR01                 TGACTTTGGCTCATGGCACGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATTCC 919
PALMS01                 TGACTTTGGCTCATGGCACGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATTCC 902
* * * * * * * * . : * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * *

```



Continuação APÊNDICE 3. Alinhamento das sequências obtidas das populações de capim-arroz, com o gene ALS de *A. thaliana* (NM\_114714.2). Em destaque, sublinhado as regiões de domínio do gene, grafados em amarelo está à trinca nucleotídica que corresponde ao aminoácido que está acima da sequência, com sua respectiva posição e, grafados em vermelho os aminoácidos que sofreram mutação. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

ArabidopsisNM_114714.2      CGTTGAGCTTTAAGACGTTTGGGGAAGCTATTCCTCCACAGTATGCGATT 1443
SUSSP01                    CCCTGGGGTACAAAACCTTTCGATGAGGAGATTAGCCACAGTATGCTATC 959
CACHS50                    CCCTGGGGTACAAAACCTTTCGATGAGGAGATTAGCCACAGTATGCTATC 974
CAMAQ01                    CCCTGGGGTACAAAACCTTTCGATGAGGAGATTAGCCACAGTATGCTATC 951
MOSTS51                    CCCTGGGGTACAAAACCTTTCGATGAGGAGATTAGCCACAGTATGCTATC 975
ARRGR01                    CCCTGGGGTACAAAACCTTTCGATGAGGAGATTAGCCACAGTATGCTATC 969
PALMS01                    CCCTGGGGTACAAAACCTTTCGATGAGGAGATTAGCCACAGTATGCTATC 952
*  **.* *: **. * * * . **.* ***** ***** **

ArabidopsisNM_114714.2      AAGGTCCTTGATGAGTTGACTGATGGAAAAGCCATAATAAGTACTGGTGT 1493
SUSSP01                    CAGGTTCTGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACTGGTGT 1009
CACHS50                    CAGGTTCTGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACTGGTGT 1024
CAMAQ01                    CAGGTTCTGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACTGGTGT 1001
MOSTS51                    CAGGTTCTGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACTGGTGT 1025
ARRGR01                    CAGGTTCTGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACTGGTGT 1019
PALMS01                    CAGGTTCTGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACTGGTGT 1002
.***** ** ***** ** .*:**.*.*****.**:. *****

ArabidopsisNM_114714.2      CGGGCAACATCAAATGTGGGCGGCGCAGTTCTACAATTACAAGAAACCAA 1543
SUSSP01                    TGGGCAACACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGACCAA 1059
CACHS50                    TGGGCAACACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGACCAA 1074
CAMAQ01                    TGGGCAACACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAA 1051
MOSTS51                    TGGGCAACACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAA 1075
ARRGR01                    TGGGCAACACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAA 1069
PALMS01                    TGGGCAACACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAA 1052
***** ** ***** ***** .*:**.*.*****.**:. *****

ArabidopsisNM_114714.2      GGCAGTGGCTATCATCAGGAGCCTTGGAGCTATGGGATTTGGACTTCCT 1593
SUSSP01                    GGCAGTGGTGTGCTTCAGCTGGTCTTGGAGCTATGGGATTTGGTTTGCCA 1109
CACHS50                    GGCAGTGGTGTGCTTCAGCTGGTCTTGGAGCTATGGGATTTGGTTTGCCA 1124
CAMAQ01                    GGCAGTGGTGTGCTTCAGCTGGTCTTGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCA 1101
MOSTS51                    GGCAGTGGTGTGCTTCAGCTGGTCTTGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCA 1125
ARRGR01                    GGCAGTGGTGTGCTTCAGCTGGTCTTGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCA 1119
PALMS01                    GGCAGTGGTGTGCTTCAGCTGGTCTTGGGCTATGGGATTTGGTTTGCCA 1102
***** .*:**.*.***** .*:**.*.*****.**:. *****

ArabidopsisNM_114714.2      GCTGCGATTGGAGCGTCTGTTGCTAACCCTGATGCGATAGTTGTGGATAT 1643
SUSSP01                    GCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACAT 1159
CACHS50                    GCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACAT 1174
CAMAQ01                    GCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACAT 1151
MOSTS51                    GCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACAT 1175
ARRGR01                    GCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACAT 1169
PALMS01                    GCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACAT 1152
***** .*:**.*.***** .*:**.*.*****.**:. *****

ArabidopsisNM_114714.2      TGACGGAGATGGAAGCTTTATAATGAATGTGCAAGAGCTAGCCACTATTC 1693
SUSSP01                    CGATGGGGATGGCAGCTTCCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCC 1209
CACHS50                    CGATGGGGATGGCAGCTTCCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCC 1224
CAMAQ01                    CGATGGGGATGGCAGCTTCCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCC 1201
MOSTS51                    CGATGGGGATGGCAGCTTCCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCC 1225
ARRGR01                    CGATGGGGATGGCAGCTTCCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCC 1219
PALMS01                    CGATGGGGATGGCAGCTTCCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCC 1202
** ** ***** ***** .*:**.*.***** .*:**.*.***** ** **

```

Continuação APÊNDICE 3. Alinhamento das sequências obtidas das populações de capim-arroz, com o gene ALS de *A. thaliana* (NM\_114714.2). Em destaque, sublinhado as regiões de domínio do gene, grafados em amarelo está à trinca nucleotídica que corresponde ao aminoácido que está acima da sequência, com sua respectiva posição e, grafados em vermelho os aminoácidos que sofreram mutação. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

ArabidopsisNM_114714.2      GTGTAGAGAATCTTCCAGTGAAGGTACTTTTATTAACAACCCAGCATCTT 1743
SUSSP01                    GCATCGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTG 1259
CACHS50                    GCATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTG 1274
CAMAQ01                    GCATCGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTG 1251
MOSTS51                    GCATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTG 1275
ARRGR01                    GCATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTG 1269
PALMS01                    GCATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTG 1252
* . * ***** * * ***** . * * . ***** . * * *
                               W574  DOMÍNIO B
ArabidopsisNM_114714.2      GGCATGGTTATGCAATGGGAAGATCGGTTCTACAAGCTAACCGAGCTCA 1793
SUSSP01                    GGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATTCTACAAGGCCAACCGAGCACA 1309
CACHS50                    GGTATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATTCTACAAGGCCAACCGAGCACA 1324
CAMAQ01                    GGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATTCTACAAGGCCAACCGAGCACA 1301
MOSTS51                    GGTATGGTGGTGCAGTTGAGGACAGATTCTACAAGGCCAACCGAGCACA 1325
ARRGR01                    GGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATTCTACAAGGCCAACCGAGCACA 1319
PALMS01                    GGGATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATTCTACAAGGCCAACCGAGCACA 1302
* * ***** . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ArabidopsisNM_114714.2      CACATTTCTCGGGGATCCGGCTCAGGAGGACGAGATATTCGCCGAACATGT 1843
SUSSP01                    CACATACTTGGGGAATCCAGAGAATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTG 1359
CACHS50                    CACATACTTGGGGAACCCAGAGAATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTG 1374
CAMAQ01                    CACATACTTGGGGAACCCAGAGAATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTG 1351
MOSTS51                    CACATACTTGGGGAACCCAGAGAATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTG 1375
ARRGR01                    CACATACTTGGGGAATCCAGAGAATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTG 1369
PALMS01                    CACATACTTGGGGAATCCAGAGAATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTG 1352
*****: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ArabidopsisNM_114714.2      TGCTGTTTGCAGCAGCTTGCGGGATTCCAGCGCGAGGGTGACAAAAGAAA 1893
SUSSP01                    TGATGATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAAGAAG 1409
CACHS50                    TGATGATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAAGAAG 1424
CAMAQ01                    TGATGATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAAGAAG 1401
MOSTS51                    TGATGATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAAGAAG 1425
ARRGR01                    TGATGATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAAGAAG 1419
PALMS01                    TGATGATTGCCAAAGGGTTCAACATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAAGAAG 1402
* * . * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ArabidopsisNM_114714.2      GCAGATCTCCGAGAAGCTATTGAGACAATGCTGGATACACCAGGACCTTA 1943
SUSSP01                    AGCGAAGTACGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCGTA 1459
CACHS50                    AGCGAAGTCCGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCGTA 1474
CAMAQ01                    AGCGAAGTCCGTGCAGCAATTAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCGTA 1451
MOSTS51                    AGCGAAGTCCGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCGTA 1475
ARRGR01                    AGCGAAGTCCGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCGTA 1469
PALMS01                    AGCGAAGTCCGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCGTA 1452
. . * * : * . * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
ArabidopsisNM_114714.2      CCTGTTGGATGTGATTGTCCGCACCAAGAACATGTGTTGCCGATGATCC 1993
SUSSP01                    CCTGTTGGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCTATGATCC 1509
CACHS50                    CCTGTTGGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCTATGATCC 1524
CAMAQ01                    CCTGTTGGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCTATGATCC 1501
MOSTS51                    CCTGTTGGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCTATGATCC 1525
ARRGR01                    CCTGTTGGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCTATGATCC 1519
PALMS01                    CCTGTTGGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCTATGATCC 1502
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



APÊNDICE 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene ALS dos biótipos de capim-arroz, com o gene ALS de *A. thaliana* (NM\_114714.2). Em destaque sublinhado as regiões de domínio do gene, grafados em cinza está o aminoácido que se mutado confere resistência aos herbicidas e grafados em negrito os aminoácidos que sofreram mutação. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos. Porto Alegre, RS. 2013.

		DOMÍNIO A <b>P197</b>	
ArabidopsisNM_114714.2	AAEGYARSSGKPGICIAATSGPGATNLVSLADALLDSVPLVAITGQV <b>P</b> RR	50	
ARRGR01	TASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSLADALLDSIPMVAITGQVPRR	50	
MOSTS51	-ASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSLADALLDSIPMVAITGQVPRR	49	
PALMS01	-ASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSLADALLDSIPMVAITGQVPRR	49	
CACHS50	-ASGFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSLADALLDSIPMVAITGQVPRR	49	
SUSSP01	----FARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSLADALLDSIPMVAITGQVPRR	46	
CAMAQ01	---GFARSSGRVGVCVATSGPGATNLVSLADALLDSIPMVAITGQVPRR	47	
	:*****: *:*:*****.*****:*.*****		
	<b>A205</b> DOMÍNIO D		
ArabidopsisNM_114714.2	MIGTDA <b>F</b> QETPIVEVTRSITKHNYLVMDVEDIPRIIEEAFFLATSGRPGP	100	
ARRGR01	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDIDDIPRVIEAFAFFLASSGRPGP	100	
MOSTS51	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDIDDIPRVIEAFAFFLASSGRPGP	99	
PALMS01	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDIDDIPRVIEAFAFFLASSGRPGP	99	
CACHS50	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDIDDIPRVIEAFAFFLASSGRPGP	99	
SUSSP01	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDIDDIPRVIEAFAFFLASSGRPGP	96	
CAMAQ01	MIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDIDDIPRVIEAFAFFLASSGRPGP	97	
	*****:*.*:*****:*.*****:*****		
ArabidopsisNM_114714.2	VLVDVPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMSRMPKPPEDSHLEQIVRLISES	150	
ARRGR01	VLVDIPKDIQQQMA----NTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGES	146	
MOSTS51	VLVDIPKDIQQQMA----NTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGES	145	
PALMS01	VLVDIPKDIQQQM-----NTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGES	144	
CACHS50	VLVDIPKDIQQQMA----NTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGES	145	
SUSSP01	VLVDIPKDIQQQMAADPVWNTNTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGES	146	
CAMAQ01	VLVDIPKDIQQQMA----NTPMSLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGES	143	
	****:*****: :.* *****:*.***** .***:***:*		
ArabidopsisNM_114714.2	KKPVLYVGGCLNNSDELGRFVELTGIPVASTLMGLGSPDCDEL <del>SL</del> HML	200	
ARRGR01	RRPVLYVGGCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRML	196	
MOSTS51	RRPVLYVGGCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRML	195	
PALMS01	RRPVLYVGGCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRML	194	
CACHS50	RRPVLYVGGCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRML	195	
SUSSP01	RRPVLYVGGCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRML	196	
CAMAQ01	RRPVLYVGGCAASGEELRRFVEMTGIPVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRML	193	
	::***** *.:** *****:*****:*****:*.** ***:**		
	DOMÍNIO F <b>D376 R377</b>		
ArabidopsisNM_114714.2	GMHGTVYANYAVEHSDLLLA <b>F</b> GVRF <b>D</b> RVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSA	250	
ARRGR01	GMHGTVYANYAVDKADLLLA <b>F</b> GVRFDDRV <b>T</b> GKIEAFASRAKIVHIDIDPA	246	
MOSTS51	GMHGTVYANYAVDKADLLLA <b>F</b> GVRFDDRV <b>T</b> GKIEAFASRAKIVHIDIDPA	245	
PALMS01	GMHGTVYANYAVDKADLLLA <b>F</b> GVRFDDRV <b>T</b> GKIEAFASRAKIVHIDIDPA	244	
CACHS50	GMHGTVYANYAVDKADLLLA <b>F</b> GVRFDDRV <b>T</b> GKIEAFASRAKIVHIDIDPA	245	
SUSSP01	GMHGTVYANYAVDKADLLLA <b>F</b> GVRFDDRV <b>T</b> GKIEAFASRAKIVHIDIDPA	246	
CAMAQ01	GMHGTVYANYAVDKADLLLA <b>F</b> GVRFDDRV <b>T</b> GKIEAFASRAKIVHIDIDPA	243	
	*****:*.*****:*****:*****.*		
ArabidopsisNM_114714.2	EIGKNKTPHVSVCADV <b>K</b> LALQGMNKVLE-NRAEELKLD <b>F</b> GVWRNELNVQK	299	
ARRGR01	EIGKNKQPHV <b>S</b> ICADV <b>K</b> LALQGMN <b>A</b> LEGGI <b>S</b> SK-SFDFGSWQDEL <b>D</b> Q <b>Q</b> K	295	
MOSTS51	EIGKNKQPHV <b>S</b> ICADV <b>K</b> LALQGMN <b>A</b> LEGGI <b>S</b> SK-SFDFGSWQDEL <b>D</b> Q <b>Q</b> K	294	
PALMS01	EIGKNKQPHV <b>S</b> ICADV <b>K</b> LALQGMN <b>A</b> LEGGI <b>S</b> SK-SFDFGSWQDEL <b>D</b> Q <b>Q</b> K	293	
CACHS50	EIGKNKQPHV <b>S</b> ICADV <b>K</b> LALQGMN <b>A</b> LEGGI <b>S</b> SK-SFDFGSWQDEL <b>D</b> Q <b>Q</b> K	294	
SUSSP01	EIGKNKQPHV <b>S</b> ICADV <b>K</b> LALQGMN <b>A</b> LEGGI <b>S</b> SK-SFDFGSWQDEL <b>D</b> Q <b>Q</b> K	295	
CAMAQ01	EIGKNKQPHV <b>S</b> ICADV <b>K</b> LALQGMN <b>A</b> LEGGI <b>S</b> SK-SFDFGSWQDEL <b>D</b> Q <b>Q</b> K	292	
	***** *****:*.***** ** ***:** ***:**		

Continuação APÊNDICE 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene ALS dos biótipos de capim-arroz, com o gene ALS de *A. thaliana* (NM\_114714.2). Em destaque sublinhado as regiões de domínio do gene, grafados em cinza está o aminoácido que se mutado confere resistência aos herbicidas e grafados em negrito os aminoácidos que sofreram mutação. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos. Porto Alegre, RS. 2013

```

ArabidopsisNM_114714.2 QKFPLSFKTFGEAIPQYAIKVLDELDTGKAIISTGVGQHQMWAQQFYNY 349
ARRGR01 REFPLGYKTFDEEIQPQYAIQVLEDELTKGEAI IATGVGQHQMWAQQYYTY 345
MOSTS51 REFPLGYKTFDEEIQPQYAIQVLEDELTKGEAI IATGVGQHQMWAQQYYTY 344
PALMS01 REFPLGYKTFDEEIQPQYAIQVLEDELTKGEAI IATGVGQHQMWAQQYYTY 343
CACHS50 REFPLGYKTFDEEIQPQYAIQVLEDELTKGEAI IATGVGQHQMWAQQYYTY 344
SUSSP01 REFPLGYKTFDEEIQPQYAIQVLEDELTKGEAI IATGVGQHQMWAQQYYTY 345
CAMAQ01 REFPLGYKTFDEEIQPQYAIQVLEDELTKGEAI IATGVGQHQMWAQQYYTY 342
::***.:**.* * *****:*****.:***:*****:***:***

```

```

ArabidopsisNM_114714.2 KKPRQWLSSGGLGAMGFGFLPAAIGASVANPDAIVVDIDGDSFLMNVQEL 399
ARRGR01 KRPRQWLSSAGLGAMGFGFLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDSFLMNIQEL 395
MOSTS51 KRPRQWLSSAGLGAMGFGFLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDSFLMNIQEL 394
PALMS01 KRPRQWLSSAGLGAMGFGFLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDSFLMNIQEL 393
CACHS50 KRPRQWLSSAGLGAMGFGFLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDSFLMNIQEL 394
SUSSP01 KRPRQWLSSAGLGAMGFGFLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDSFLMNIQEL 395
CAMAQ01 KRPRQWLSSAGLGAMGFGFLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDSFLMNIQEL 392
*.:*****.***** **:*:***. . *****:***:***

```

DOMÍNIO B **W**<sub>574</sub>

```

ArabidopsisNM_114714.2 ATIRVENLPVKVLLLNQHLGMVQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQEDEF 449
ARRGR01 AMIRIENLPVKVFLVNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIY 445
MOSTS51 AMIRIENLPVKVFLVNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIY 444
PALMS01 AMIRIENLPVKVFLVNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIY 443
CACHS50 AMIRIENLPVKVFLVNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIY 444
SUSSP01 AMIRIENLPVKVFLVNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIY 445
CAMAQ01 AMIRIENLPVKVFLVNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIY 442
* *.:*****.:*****:* *****:***:* :*.***:

```

```

ArabidopsisNM_114714.2 PNMLLFAAACGIPAARVTKKADLREAIQTMLDTPGPYLLDVIQPHQEHVL 499
ARRGR01 PDFVTTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETGPGYLLDIIIVPHQEHVL 495
MOSTS51 PDFVTTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETGPGYLLDIIIVPHQEHVL 494
PALMS01 PDFVTTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETGPGYLLDIIIVPHQEHVL 493
CACHS50 PDFVTTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETGPGYLLDIIIVPHQEHVL 494
SUSSP01 PDFVTTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETGPGYLLDIIIVPHQEHVL 495
CAMAQ01 PDFVTTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKMLETGPGYLLDIIIVPHQEHVL 492
*.: :* . .***.*****:.* **:.***:*****:* *****

```

DOMÍNIO E **S**<sub>653</sub> **G**<sub>654</sub>

```

ArabidopsisNM_114714.2 PMIPSGGTFNDVITEGDGRIKYRNRLLSEPFMFVFCIWKNLVCN--FLFVL 547
ARRGR01 PMIPSGGAFKDMILDGDGRTVYSGFQQAVPLLSFDIAYELVQE----CVL 541
MOSTS51 PMIPSGGAFKDMILDGDGRTVYSGFQQAVPLLSFDIAYELVQE----CVL 540
PALMS01 PMIPSGGAFKDMILDGDGRTVYSGFQQAVPLLSFDIAYELVQE----CVL 539
CACHS50 PMIPSGGAFKDMILDGDGRTVYSGFQQAVPLLSFDIAYELVQE----CVL 540
SUSSP01 PMIPSGGAFKDMILDGDGRTVYSGFQQAVPLLSFDIAYELVQE----CVL 541
CAMAQ01 PMIPSGGAFKDMILDGDGRTVYSGFQQAVPLLSFDIAYELVQE----CVL 538
***.***:***:*** * . . :. * :** : **

```

```

ArabidopsisNM_114714.2 VIVSFSCSACFL-----VYVRLLLLLLFGFLSFILINNPVRFTPC 587
ARRGR01 PVCSP-CSVDSV-----VNSGPHLFLMCLFDVLWYGN----- 572
MOSTS51 PVCSP-CSVDSV-----VNSGPHLFLMCLFDVLWYGN----- 571
PALMS01 PVCSP-CSVDSV-----VNSGPHLFLMCLFDVLWYGN----- 570
CACHS50 PVCSP-CSVDSV-----VNSGPHLFLMCLFDVLWYGN----- 571
SUSSP01 PVCSP-CSVDSV-----VNSGPHLFLMCLFDVLWYGN----- 572
CAMAQ01 PVCSP-CSVDSV-----VNSGPHLFLMCLFDVLWYGN----- 569
: * ** . : * **:* * : *

```

## 8 VITA

Everton Danilo Bortoly é filho de Carlos Ramiro Bortoly e Fátima Clarice Schneider Bortoly, Nasceu em Santa Bárbara do Sul/RS, em 18 de julho de 1988. Em 2004 completou o ensino médio no colégio ULBRA São Pedro, na cidade de Cachoeira do Sul/RS. Em 2005, iniciou o curso de Agronomia na Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), onde cursou até 2006. Em 2007, ingressou na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde graduou Engenheiro Agrônomo em 2011. Em 2008, foi bolsista voluntário na área de Herbologia sob orientação do Prof. Dr. Sérgio Luiz de Oliveira Machado. Em 2009, foi monitor da disciplina de plantas daninhas. Em 2011, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS, em Porto Alegre/RS, sob orientação do Professor Dr. Aldo Merotto jr.também com apoio financeiro do CNPq.