

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANTONIO PEDRO BRUSAMARELLO

**HERANÇA GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES  
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE *Euphorbia heterophylla* L. AOS  
HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS E PROTOX**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2016

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ANTONIO PEDRO BRUSAMARELLO**

**HERANÇA GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES  
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE *Euphorbia heterophylla* L. AOS  
HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS E PROTOX**

**DISSERTAÇÃO**

**PATO BRANCO**

**2016**

ANTONIO PEDRO BRUSAMARELLO

**HERANÇA GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES  
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DE *Euphorbia heterophylla* L. AOS  
HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS E PROTOX**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell  
Trezzi

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique de  
Oliveira

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taciane Finatto

PATO BRANCO

2016

B912h Brusamarello, Antonio Pedro.  
Herança genética e marcadores moleculares associados à resistência de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX / Antonio Pedro Brusamarello. -- 2016.  
125 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi  
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique de Oliveira  
Coorientadora: Profa. Dra. Taciane Finatto  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2016.  
Bibliografia: f. 105-120.

1. Ervas daninhas - Controle. 2. Inibidores enzimáticos. 3. Herbicidas. I. Trezzi, Michelangelo Muzell, orient. II. Oliveira, Paulo Henrique de, coorient. III. Finatto, Taciane, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por  
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Pato Branco  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Título da Dissertação nº 124**

**HERANÇA GENÉTICA E MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À  
RESISTÊNCIA DE *Euphorbia heterophylla* L. AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA  
ALS E PROTOX**

por

**ANTONIO PEDRO BRUSAMARELLO**

Dissertação apresentada às 08 horas 30 min. do dia 12 de fevereiro de 2016 como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

---

**Prof. Dr. Sidinei José Lopes**  
UFSM

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taciane Finatto**  
UFPR  
Co-orientadora

---

**Prof. Dr. Paulo Henrique de  
Oliveira**  
UTFPR  
Co-orientador

---

**Prof. Dr. Michelangelo Muzell  
Trezzi**  
UTFPR  
Orientador

---

**Prof. Dr. Giovani Benin**  
Coordenador do PPGAG

\* O termo de Aprovação com as assinaturas encontram-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Dedico este trabalho a minha namorada Micheli Negri.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por tudo que sou.

Agradeço a minha namorada Micheli Negri pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e apoio durante esta caminhada.

Agradeço aos meus sogros Darci Luís Negri e Silvana Alberti Negri pelo apoio, compreensão, exemplo de vida e ajuda nesta etapa de minha vida.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus pais Joaquim e Teresinha pelo incentivo e exemplo de vida.

Agradeço ao meu orientador Michelangelo Muzell Trezzi e co-orientadores Paulo Henrique de Oliveira e Taciane Finatto pelo apoio, colaboração, paciência, conhecimentos repassados, exemplos e inspiração.

Agradeço a todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para que mais esse objetivo em minha vida fosse alcançado com sucesso.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo” – **Vinícius de Moraes**.

## RESUMO

BRUSAMARELLO, Antonio Pedro. Herança Genética e Marcadores Moleculares Associados à Resistência de *Euphorbia heterophylla* L. aos Herbicidas Inibidores da ALS e PROTOX. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a herança genética, determinar o melhor protocolo de extração de DNA para esta espécie, e identificar marcadores moleculares associados à resistência de leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX. A herança genética da resistência foi determinada a partir de cruzamentos entre os biótipos de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R), retrocruzamentos e avanço de geração para F<sub>2</sub>. A dominância completa da resistência foi comprovada com curvas de dose resposta. Foram testados dez protocolos de extrações de DNA adaptados de métodos descritos na literatura. Os iniciadores específicos para os genes ALS e PROTOX foram desenhados a partir da sequência de DNA consenso destes genes, obtida pelo alinhamento das espécies *Manihot esculenta* e *Ricinus communis*. Adicionalmente, foi testada a transferibilidade de vinte marcadores SSRs (sequências simples repetidas) desenhados para o genoma de *Manihot esculenta*, pois dentre espécies de Euphorbiaceae com maior número de marcadores SSRs desenvolvidos, é a espécie filogeneticamente mais próxima de *E. heterophylla*. Em relação à herança genética, as frequências observadas nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>s</sub> e RC<sub>r</sub> não diferiram estatisticamente das frequências esperadas para característica controlada por dois genes dominantes para resistência múltipla e um gene dominante para resistência simples aos inibidores da ALS e PROTOX. Os níveis similares de resistência observados para o heterozigoto F<sub>1</sub> e o biótipo homozigoto R, para doses de até 2000 g i.a. ha<sup>-1</sup> de fomesafen e doses de até 800 g i.a. ha<sup>-1</sup> de imazethapyr, confirmam a dominância completa da resistência aos inibidores da PROTOX e ALS, respectivamente. O protocolo 0,2%BME possibilitou a extração de 7,083 ng µL<sup>-1</sup> de DNA, sendo estatisticamente (P=0,05) superior aos demais protocolos. Os compostos fenólicos contaminaram o DNA extraído pelos protocolos FENOL e 3%BME+TB, mas a adição de polivinilpirrolidona (PVP40) no tampão de extração do protocolo 3%BME+TA solucionou este problema. Os iniciadores desenhados para os genes ALS e PROTOX não amplificaram ou não apresentaram polimorfismo visível em gel de agarose entre os biótipos S e R de *E. heterophylla*. Dez marcadores SSR foram transferidos para *E. heterophylla* e destes, seis iniciadores apresentaram polimorfismo entre os biótipos S e R.

**Palavras-chave:** Planta daninha. Inibidores de enzimas. Iniciadores. Protocolos de extração.

## ABSTRACT

BRUSAMARELLO, Antonio Pedro. Genetic Inheritance and Molecular Markers Associated with *Euphorbia heterophylla* L. Resistance to ALS- and PROTOX-Inhibiting Herbicides. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2016.

This study aimed to assess the genetic inheritance, determine the better DNA isolation protocol for this species and to identify molecular markers associated with the Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) resistance ALS- and PROTOX-inhibiting herbicides and. The genetic inheritance of resistance was determined from crosses between *E. heterophylla* biotypes susceptible (S) and resistant (R), backcrosses and F<sub>2</sub> generation. The complete dominance of resistance was confirmed with dose response curves. Ten adjusted methods for DNA isolation described in the literature were tested. The specific primers for ALS and PROTOX genes were designed from the consensus DNA sequence of these genes, obtained by aligning the gene sequences of the species *Manihot esculenta* and *Ricinus communis* L. Additionally, it was assessed the transferability of twenty SSR (simple sequence repeat) markers designed for *Manihot esculenta*, because among the species of Euphorbiaceae with more developed SSRs markers, because it is the closest relative phylogenetic species of *E. heterophylla*. Regarding genetic inheritance, the frequencies observed in the F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>s</sub> and RC<sub>r</sub> did not differ significantly from the expected frequencies for a trait controlled by two dominant genes for multiple resistance and a single dominant gene for simple resistance to ALS- and PROTOX-inhibiting herbicides. The similar levels of resistance to dosage up to 2000 g i.a. ha<sup>-1</sup> of fomesafen and dosage up to 800 g i.a. ha<sup>-1</sup> of imazethapyr observed in F<sub>1</sub> (heterozygous) and homozygous R biotype confirm the complete dominance of resistance to PROTOX- and ALS-inhibiting herbicides, respectively. The 0.2%BME protocol allowed the isolation of 7,083 ng μL<sup>-1</sup> DNA, significantly (P=0.05) higher than other methods. Co-isolation of phenolic compounds was observed in FENOL and 3%BME+TB methods, but the addition of polyvinylpyrrolidone (PVP40) in the protocol extraction buffer 3%BME+TA solved this problem. The primers designed for ALS and PROTOX genes amplified but not showed no visible polymorphism in agarose gel between the S and R biotypes of *E. heterophylla*. Regarding the SSR transferability, ten markers were transferred to *E. heterophylla*, however, these six primers showed polymorphism among S and R biotypes..

**Keywords:** Weed. Inhibitors of enzymes. Primers. DNA isolation methods.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Controle [100 - Controle (%)] dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto F<sub>1</sub> e homocigoto resistente, em função das doses de fomesafen aos 7, 14 e 21 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 63
- Figura 2** – Matéria verde e matéria seca (% em relação à testemunha) dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto (F<sub>1</sub>) e homocigoto resistente, em função das doses de fomesafen aos 21 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 64
- Figura 3** – Controle [100 - Controle (%)] dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto F<sub>1</sub> e homocigoto resistente, em função das doses de imazethapyr aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 67
- Figura 4** – Matéria verde e matéria seca (% em relação à testemunha) dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto F<sub>1</sub> e homocigoto resistente, em função das doses de imazethapyr aos 28 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 69
- Figura 5** – Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de plantas F<sub>1</sub> de *E. heterophylla* resistente aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso de iniciadores desenhados para o gene ALS (>003211m e >003211m812) e PROTOX (>PPX1, >PPX2 e >PPX2745). Marcador de peso molecular de 100 pb (M), amostra negativa sem DNA (-) e amostra positiva com DNA (+). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 89
- Figura 6** – Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso de iniciadores desenhados para o gene ALS (>003211m e >003211m812) e PROTOX (>PPX1, >PPX2 e >PPX2745), através da técnica de PCR *touchdown* com temperaturas de anelamento de 60 °C, 56 °C e 53 °C. Marcador de peso molecular de 100 pb (M), amostra negativa sem DNA (-) e repetições (1 e 2). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 90
- Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose (2,5%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com iniciadores do tipo SSR transferidos de *M. esculenta*. Marcador de peso molecular de 100 pb (M). Utilizou-se temperatura de anelamento de 53 °C e 35 ciclos na PCR. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 93
- Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose (3%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com iniciadores do tipo SSR transferidos de *M. esculenta*. Marcador de peso molecular de 50 pb (M50pb) e 100 pb (M100pb). Utilizou-se temperatura de anelamento de 58 °C e 40 ciclos na PCR, com duas repetições para cada um dos biótipos. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 95
- Figura 9** – Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso do iniciador SSR EME19514 transferidos de *M. esculenta*. Marcador de peso molecular de 100 pb (M). Utilizou-se temperatura de anelamento de 53 °C e 35 ciclos na PCR, com quatro repetições para cada um dos biótipos. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.96
- Figura 10** – Eletroforese em gel de agarose (1%) de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível aos inibidores da ALS/PROTOX, obtido a partir dos 10 protocolos de extração, com quatro repetições por protocolo. Utilizou-se 4 µL de DNA para cada amostra, que permaneceram migrando no gel por 45 minutos à 85 Volts. Marcador de peso molecular de 10 kpb (M). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 99
- Figura 11** – Perfil eletroforético em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso do iniciador SSR EME19514 transferidos de *M. esculenta*, para os diferentes protocolos de extração com quatro repetições por protocolo. Marcador de peso molecular de 100 pb (M).

Utilizou-se temperatura de anelamento de 53 °C e 35 ciclos na reação de PCR. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 101

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Nível de controle em porcentagem (\*), número de plantas (n), média ( $\bar{X}$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) de cada população (P) de *E. heterophylla* para os três cruzamentos (C). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 53
- Tabela 2** – Parâmetros genéticos para a resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da PROTOX e ALS. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 55
- Tabela 3** – Resposta das populações S, R, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>s</sub> e RC<sub>r</sub> nas diferentes classes, submetidas a aplicação do herbicida fomesafen e sequencial com imazethapyr. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 56
- Tabela 4** – Resposta das populações F<sub>2</sub> e RC<sub>s</sub> nas diferentes classes, submetidas à aplicação do herbicida imazethapyr e sequencial com fomesafen. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 59
- Tabela 5** – Resposta da população segregante F<sub>2</sub> nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida fomesafen. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 60
- Tabela 6** – Resposta da população segregante do retrocruzamento suscetível (RC<sub>s</sub>) nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida fomesafen inibidor da enzima PROTOX. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 60
- Tabela 7** – Resposta da população segregante F<sub>2</sub> nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida imazethapyr. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 61
- Tabela 8** – Resposta da população segregante do retrocruzamento suscetível (RC<sub>s</sub>) nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida imazethapyr. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 62
- Tabela 9** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro (QME), fator de resistência (FR) e probabilidade (P) para o nível de controle das populações suscetível, heterozigoto F<sub>1</sub> e resistente aos 7, 14 e 21 DAA do herbicida fomesafen. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 65
- Tabela 10** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro (QME), fator de resistência (FR) e probabilidade (P) para matéria verde (MV) e matéria seca (MS) das populações suscetível, heterozigoto F<sub>1</sub> e resistente aos 21 DAA do herbicida fomesafen. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 65
- Tabela 11** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro (QME), fator de resistência (FR) e probabilidade (P) para o nível de controle das populações suscetível, heterozigoto F<sub>1</sub> e resistente aos 7, 14, 21 e 28 DAA do herbicida imazethapyr. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 68
- Tabela 12** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro (QME), fator de resistência (FR) e probabilidade (P) para matéria verde (MV) e matéria seca (MS) das populações suscetível, heterozigoto F<sub>1</sub> e resistente aos 28 DAA do herbicida imazethapyr. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 70
- Tabela 13** – Resumo dos protocolos de extração de DNA. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 77
- Tabela 14** – Preparo do Tampão de Extração A. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 78
- Tabela 15** – Preparo do Tampão de Extração B. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 79
- Tabela 16** – Resultado do alinhamento local (tBLASTn) a partir de sequências de aminoácidos do gene PROTOX (PPX1 e PPX2L) de *A. tuberculatus* com *M. esculenta* e *R. communis*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. .... 82
- Tabela 17** – Iniciadores degenerados desenhados a partir de sequências de aminoácidos do gene PROTOX de *M. esculenta* e *R. communis*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. 83

<b>Tabela 18</b> – Resultado do alinhamento local (tBLASTn) a partir de sequências de aminoácidos do gene <i>ALS</i> de diferentes espécies com <i>M. esculenta</i> e <i>R. communis</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. ....	84
<b>Tabela 19</b> – Iniciadores degenerados desenhados a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos do gene <i>ALS</i> das espécies <i>M. esculenta</i> e <i>R. communis</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. ....	84
<b>Tabela 20</b> – Lista de iniciadores SSR transferidos de <i>M. esculenta</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. ....	86
<b>Tabela 21</b> – Médias estimadas dos protocolos de extração para concentração DNA e razão $OD_{260}/OD_{280}$ , com agrupamento de médias pelo teste de Scott Knott a 5%. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.....	98

## LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

BASF	<i>Badische Anilin Und Soda-Fabrik</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PGDB	<i>Plant Genome DataBase Japan</i>
PR	Unidade de Federação – Paraná
RS	Unidade de Federação – Rio Grande do Sul
SC	Unidade de Federação – Santa Catarina
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\chi^2_{\text{Cal}}$	Qui-quadrado calculado
$\chi^2_{\text{Tab}}$	Qui-quadrado tabelado
$\sigma_A$	Variância aditiva
$\sigma_D$	Variância de dominância
$\sigma_E$	Variância ambiental
$\sigma_F$	Variância fenotípica
$\sigma_G$	Variância genética
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
ALS	Acetolactato sintase
ALS/PROTOX	Resistência múltipla aos ALS e PROTOX
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool of nucleotide</i>
BME	B-Mercaptoetanol
BOD	<i>Demanda bioquímica de oxigênio</i>
$C_{50}$	Dose que proporciona 50% de controle
CIA	Clorofórmio Álcool Isoamílico
cm	Centímetro
$\text{CO}_2$	Gás carbônico
CTAB	Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil-amônio
DAA	Dias após aplicação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
$F_1$	Primeira geração após cruzamento
$F_2$	Segunda geração após cruzamento
FD	Fator de diluição
FR	Fator de resistência
FV	Fator de variação
g	Grama
$\text{g ha}^{-1}$	Gramas por hectare
GL	Graus de liberdade
$\text{GR}_{50}$	Dose que proporciona 50% de redução da MV ou MS
h	Herdabilidade
$h^2_a$	Herdabilidade no sentido amplo
$h^2_r$	Herdabilidade no sentido restrito
ha	Hectares
HCl	Ácido Clorídrico
i.a.	Ingrediente ativo
kpb	Mil pares de base
L	Litro
$\text{L ha}^{-1}$	Litros por hectare
m	Metro
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Matéria seca

MV	Matéria verde
N <sup>o</sup> ou n <sup>o</sup>	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
NiCl	Cloreto de Lítio
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica
OD <sub>260</sub>	Densidade óptica a 260 nm
OD <sub>280</sub>	Densidade óptica a 280 nm
P	Probabilidade
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmoles	Picomoles
PROTOX	Protoporfirinogênio oxidase
PVP40	<i>Polyvinylpyrrolidone</i> – Polivinilpirrolidona
PVPP	<i>Poly(vinylpyrrolidone)</i> – Polivinilpolipirrolidona
QME	Quadrado médio do erro
R	Resistente
RC <sub>r</sub>	Retrocruzamento resistente
RC <sub>s</sub>	Retrocruzamento suscetível
rpm	Rotações por minuto
S	Suscetível
SSR	Sequências Simples Repetidas (Microsatélite)
TE	Tris + EDTA
TRIS	Tris hidroximetil aminometano (Tris Base)
v/v	Volume/volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\chi^2$	Qui-quadrado
%	Porcentagem
$\Sigma$	Somatório
$\beta$	Beta
$\mu$	Micro
>	Maior que
<	Menor que
=	Igual
°C	Graus Célsius
V	Volts
:	Para
[ ]	Concentração
$\bar{X}$	Média aritmética
$\sigma$	Variância

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>19</b>
1.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS, MORFOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Euphorbia heterophylla</i> L. ....	19
1.2 RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS .....	20
1.2.1 Resistência aos Herbicidas Inibidores da ALS .....	24
1.2.1.1 Mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS .....	26
1.2.2 Resistência aos Herbicidas Inibidores da PROTOX.....	27
1.2.2.1 Mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX.....	29
1.2.3 Resistência Múltipla aos Herbicidas .....	30
1.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO EM PLANTAS DANINHAS .....	32
1.3.1 Bases Moleculares da Resistência aos Inibidores da ALS.....	34
1.3.2 Bases Moleculares da Resistência aos Inibidores da PROTOX .....	35
1.3.3 Transferibilidade de Iniciadores SSR .....	38
1.3.4 Protocolos de Extração de DNA.....	39
<b>2 HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX EM <i>Euphorbia heterophylla</i> L.</b> .....	<b>42</b>
2.1 RESUMO.....	42
2.2 ABSTRACT .....	43
2.3 INTRODUÇÃO .....	43
2.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
2.4.1 Obtenção dos Biótipos .....	45
2.4.2 Teste Preliminar Frente aos Herbicidas Inibidores da ALS e PROTOX .....	45
2.4.3 Realização dos Cruzamentos e Retrocruzamentos Entre os Biótipos .....	46
2.4.4 Etapa de Fenotipagem .....	47
2.4.4.1 Obtenção das proporções fenotípicas nas gerações segregantes F <sub>2</sub> e RC <sub>s</sub> .....	48
2.4.5 Curva de Resposta à Dose .....	49
2.4.6 Análises Estatísticas .....	49
2.4.6.1 Estimativa do número de genes .....	50
2.4.6.2 Componentes das variâncias .....	50
2.4.6.3 Herdabilidade .....	51
2.4.6.4 Modelos de regressão .....	51
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52

2.5.1 Determinação do Número de Genes .....	52
2.5.2 Curvas de Resposta à Dose.....	62
2.6 CONCLUSÕES .....	72
<b>3 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX EM <i>Euphorbia heterophylla</i> E DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA .</b>	<b>73</b>
3.1 RESUMO.....	73
3.2 ABSTRACT .....	74
3.3 INTRODUÇÃO .....	74
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	76
3.4.1 Protocolos de Extração de DNA Específicos para <i>E. heterophylla</i> .....	76
3.4.2 Iniciadores .....	82
3.4.2.1 Desenho de iniciadores .....	82
3.4.2.2 Transferibilidade de iniciadores SSRs.....	84
3.4.2.3 Extração de DNA genômico, amplificação de DNA (PCR-SSR) e eletroforese .....	87
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
3.5.1 Marcadores Moleculares .....	88
3.5.2 Transferibilidade de Marcadores SSR.....	91
3.5.3 Protocolos de Extração de DNA.....	96
3.6 CONCLUSÕES .....	102
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>124</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS, MORFOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *Euphorbia heterophylla* L.

O leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.) é uma espécie daninha anual pertencente à família *Euphorbiaceae*. As plantas são lactescentes, eretas, com 30-80 cm de altura (LORENZI et al., 2006), podendo chegar até 2 m quando se desenvolvem sob boas condições de ambiente (KISSMANN; GROTH, 1999). Apresentam rápido desenvolvimento inicial, emergência em fluxos, ampla variabilidade genética (TREZZI; MACHADO; XAVIER, 2014), elevada capacidade competitiva com as espécies cultivadas (KISSMANN; GROTH, 1999; MACHADO et al., 2015) e ciclo relativamente curto, possibilitando até três gerações por ano.

O leiteiro é uma espécie nativa em regiões tropicais e subtropicais das Américas (KISSMANN; GROTH, 1999) e muito frequente em lavouras cultivadas no Sul, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (VARGAS; BORÉM; SILVA, 1999).

Nessa espécie, a parte superior dos ramos e caules se divide formando bifurcações, em cujo ápice se desenvolve a inflorescência, também presente em alguns casos junto às axilas das folhas. As flores, também chamadas de ciátios, são involúcros obovóides formados por brácteas fusionadas, abertos na parte superior. Um ciátio apresenta apenas uma flor feminina, apoiada sobre um grosso pedicelo, que após a fecundação se alonga posicionando o fruto de forma pendente ao lado do involúcro e pode apresentar de 30 a 40 flores masculinas articuladas no pedicelo no interior do ciátio circundando a flor feminina (KISSMANN; GROTH, 1999).

Na maioria das *Euphorbiaceae*, a polinização ocorre por insetos (moscas, abelhas, vespas e borboletas) que estão á procura de néctar, no entanto, para os gêneros: *Acalypha*, *Ricinus*, *Alchornea* e alguns outros, a polinização ocorre pelo vento. A polinização cruzada na família *Euphorbiaceae* é promovida pela maturação das flores carpeladas antes das estaminadas (JUDD et al., 2009).

A reprodução de *E. heterophylla* pode ocorrer tanto através de autofecundação quanto de fecundação cruzada (BARROSO, 2002), não havendo relatos na literatura de estudos envolvendo as taxas de fecundação cruzada e de autofecundação para essa espécie. Quando o fruto atinge a maturação completa,

dispersa as sementes para longe da planta mãe, através do mecanismo tipo bolocoria (deiscência explosiva) (BARROSO, 2002). Geralmente apresentam pouca dormência e sua causa ainda não é esclarecida. A germinação é favorecida na presença de luz e temperaturas entre 25 a 35 °C (KISSMANN; GROTH, 1999).

## 1.2 RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS

A evolução da resistência aos herbicidas em plantas daninhas é um exemplo clássico da rápida adaptação das plantas em resposta a seleção imposta pelo homem (NEVE et al., 2014). A utilização intensa e indiscriminada de herbicidas com mesmo mecanismo de ação na mesma área de cultivo ao longo dos anos tem proporcionado a seleção de diversas espécies daninhas resistentes (INOUE; OLIVEIRA Jr, 2011). Nesse contexto, é de fundamental importância a definição dos principais termos que abrangem a resistência das plantas daninhas.

A resistência é definida como a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos de plantas daninhas dentro de uma população sobreviverem e se reproduzirem após a exposição a uma dose de herbicida, que em condições normais, controla com eficácia esta população de plantas da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; OVEJERO, 2008; INOUE; OLIVEIRA Jr, 2011). O biótipo é definido como um grupo de indivíduos com carga genética similar, que pouco se diferencia da maioria dos indivíduos da população (INOUE; OLIVEIRA Jr, 2011).

A resistência cruzada ocorre quando um biótipo de planta daninha apresenta resistência a dois ou mais herbicidas de um mesmo mecanismo de ação, geralmente com resistência a todos os herbicidas pertencentes ao mecanismo de ação. A resistência múltipla ocorre quando um biótipo de planta daninha apresenta resistência a um ou mais mecanismos de resistência diferentes que conferem a resistência aos herbicidas de diferentes mecanismos de ação (CHRISTOFFOLETI; OVEJERO, 2008; KISSMANN, 2014). Dessa forma, a dificuldade de controle obedece a seguinte ordem: resistência simples < cruzada < múltipla (CHRISTOFFOLETI; OVEJERO, 2008).

No mundo, os casos de resistência têm aumentado de forma muito expressiva ao longo dos anos, sendo identificados 460 casos únicos de resistência,

em que 237 casos ocorrem em dicotiledôneas (143 espécies) e 223 em monocotiledôneas (103 espécies), conferindo resistência para 22 dos 25 mecanismos de ação herbicida conhecidos (HEAP, 2016).

Segundo Ohmes e Kendig (1999), a resistência em uma população pode surgir devido à mutação através da intensidade de seleção recorrente, que altera uma população suscetível para uma resistente de geração em geração e devido à preexistência de genes de resistência na população. As mutações podem ocorrer antes ou após a aplicação do herbicida, não havendo evidências de que pode ser induzida pelos herbicidas (INOUE; OLIVEIRA Jr, 2011; RIZZARDI et al., 2002). Hipótese não testada sugere que herbicidas inibidores da ALS podem ser indutores de mutação, contribuindo para o surgimento de plantas daninhas resistentes aos herbicidas (VIDAL; WINKLER, 2002; OLDACH et al., 2008).

Dessa forma, os herbicidas aplicados sobre uma população de plantas exercem o papel de agente selecionador das plantas resistentes que se encontram em baixa frequência na área (INOUE; OLIVEIRA Jr, 2011; RIZZARDI et al., 2002).

Dentre os mecanismos que conferem a resistência das plantas daninhas aos herbicidas pode-se citar alteração no local de ação, metabolização, compartimentalização, absorção, translocação (INOUE; OLIVEIRA Jr, 2011; SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002), superexpressão da enzima (GAINES et al., 2010) e exsudação radicular (FERREIRA, 2008).

A alteração no local de ação ocorre devido a modificações gênicas (mutações) no DNA (INOUE; OLIVEIRA Jr, 2011), que podem envolver a adição, deleção, ou a substituição de um ou mais nucleotídeos (MALACINSKI, 2011), sendo mais comum a substituição de um nucleotídeo por outro, gerando modificação no códon (sequência de três bases nitrogenadas) que passa a codificar outro aminoácido. Essa alteração genética pode dar origem a uma enzima com característica funcional diferente da original, em que a molécula do herbicida se torna incapaz de exercer a sua ação fitotóxica no local de ação na planta (CHRISTOFFOLETI; OVEJERO, 2008).

Segundo Ossowski et al. (2010) a taxa de mutação espontânea é de  $7 \times 10^{-9}$  substituições de base por sítio por geração, sendo na maioria as transições G:C e A:T. Além disso, as mutações geralmente são deletérias e para a ocorrência

de uma planta mutante resistente, a mutação tem que ocorrer no local de ação do herbicida, reduzindo ainda mais as chances de ocorrência.

O aumento da capacidade de metabolização do herbicida ocorre quando um biótipo tem a capacidade de metabolizar a molécula do herbicida de forma mais rápida do que um biótipo suscetível e/ou conjugar o herbicida para componentes menos fitotóxicos, dessa forma, tornando a molécula inativa antes que cause danos irreversíveis na planta (CHRISTOFFOLETI; FILHO; SILVA, 1994; SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002). Nesse processo atuam as enzimas monooxigenases do citocromo P450 e a glutationa-s-transferase (GST), proporcionando reações de oxirredução e conjugação, respectivamente (CHRISTOFFOLETI; OVEJERO, 2008).

A compartimentalização ocorre pela remoção dos herbicidas dos locais metabolicamente ativos e seu armazenamento nos vacúolos das células ou tecidos distantes do sítio de ação do herbicida (CHRISTOFFOLETI; FILHO; SILVA, 1994).

A alteração da absorção e da translocação dos herbicidas pode ocorrer de forma isolada ou associada, proporcionando redução na quantidade de herbicida que chega até o local de ação, não sendo suficiente para proporcionar o controle da planta (SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002).

Considerando-se uma população de plantas, inicialmente a resistência é imperceptível e confundida com falhas de aplicação, pois o número de plantas resistentes é muito pequeno. De uma forma geral, torna-se perceptível após alguns anos de uso contínuo do mesmo mecanismo de ação (KISSMANN, 2014), quando um número já expressivo de plantas da espécie daninha estão resistentes (GRESSEL; SEGEL, 1978).

Muitos fatores influenciam a probabilidade de evolução de resistência aos herbicidas em plantas daninhas e alguns herbicidas são mais propensos à evolução da resistência do que outros (PATZOLDT et al., 2006). A dinâmica da resistência e seu impacto são dependentes de características genéticas, da biologia da planta daninha, de características dos herbicidas e de características operacionais (CHRISTOFFOLETI et al., 2008; POWLES; YU, 2010).

A menor ou maior probabilidade do surgimento de resistência é determinada principalmente pela frequência inicial do gene de resistência (VIDAL;

FLECK, 1997), que é influenciada pela taxa de mutação. Assim, uma maior frequência inicial do biótipo resistente eleva a probabilidade de sobrevivência e capacidade de aumentar sua proporção na área após sucessivas aplicações do agente selecionador.

Características operacionais são as mais facilmente manipuladas pelo homem, através das quais é possível reduzir a pressão de seleção sobre as plantas daninhas, retardando ou evitando o surgimento de indivíduos resistentes. Envolve práticas, tais como: a utilização da dose recomendada do herbicida, habilidade do operador, adequada manutenção e conservação de máquinas de tratamento, utilização de calendário de aplicação, cuidados com as condições do ambiente no momento da aplicação (umidade do ar, temperatura do ar, velocidade do vento), rotação de culturas, alternância de mecanismos de ação e a adoção de práticas de manejo sem o uso de herbicidas (POWLES; YU, 2010).

A importância da rotação de culturas como forma de alternância no uso dos diferentes mecanismos de ação é destacada por Nunes, Schaedler e Lamego (2014), já que, nem sempre o herbicida que é seletivo para uma cultura será seletivo para a cultura seguinte em rotação. Assim, reduz-se a pressão de seleção, diminuindo a probabilidade de seleção de biótipos resistentes aos herbicidas.

O tipo de herança dos alelos da resistência traz implicações práticas importantes, visto que, na herança nuclear, os genes de resistência presentes em um indivíduo R podem ser transferidos via fluxo de pólen para indivíduos S, enquanto que na herança materna ou citoplasmática, a transmissão ocorre apenas através da planta mãe, independentemente do tipo de fecundação da espécie (MATIELLO; RONZELLI Jr; PURÍSSIMO, 1999; SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002). Isso sugere que a disseminação da resistência em uma área ocorre mais rapidamente quando o modo de herança for do tipo nuclear (EMBRAPA, 2006; SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002).

Além disso, quando a característica de resistência é conferida por vários genes (poligênica), menor é a probabilidade de ocorrer e mais lenta será a sua evolução, e quando é conferida pela ação de um único gene (monogênica), maior será a probabilidade de ocorrer e mais rápida será a evolução (SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002).

Os casos de resistência em *E. heterophylla* foram identificados no Equador com inibidores do fotossistema II em 1990, no Paraguai, com inibidores da ALS em 1995 e no Brasil, com inibidores da ALS em 1993 e resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX em 2004 (HEAP, 2016). Os casos registrados no Brasil trouxeram grande preocupação no meio agrícola até o surgimento e liberação do evento transgênico RR em soja.

O advento da soja transgênica resistente ao herbicida glifosato (inibidor da enzima EPSPs - 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase) impactou positivamente sobre o controle de leiteiro resistente aos inibidores da ALS (VARGAS et al., 2013) e com resistência múltipla ao ALS e PROTOX (TREZZI et al., 2009), minimizando os problemas proporcionados por essas resistências. No entanto, mesmo após longo tempo de uso do glifosato existem biótipos de leiteiro resistente a ALS (VARGAS et al., 2013; XAVIER, 2014), que estão presentes em áreas onde houve escapes e/ou onde as sementes permanecem viáveis no banco (XAVIER, 2014).

Em lavouras de soja no Brasil, até hoje foi identificado resistência ao glifosato nas espécies daninhas: *Chloris elata*, *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis*, *Conyza sumatrensis*, *Digitaria insularis*, *Lolium perenne ssp. multiflorum* (HEAP, 2016), representando graves problemas para a agricultura brasileira, requerendo o emprego de outros mecanismos de ação para efetuar o controle dessas espécies, entre eles o uso dos inibidores da ALS (VARGAS et al., 2013) e da PROTOX.

Portanto, a simples mudança no manejo das plantas daninhas na cultura da soja, com retorno do uso de herbicidas inibidores da ALS e PROTOX em áreas onde havia presença de *E. heterophylla* e de outras espécies resistentes a esses mecanismos de ação, pode provocar, em pouco tempo, aumento da frequência das plantas resistentes a esses mecanismos, se tornando novamente um problema agrícola.

### 1.2.1 Resistência aos Herbicidas Inibidores da ALS

A enzima ALS (acetolactato sintase) é essencial para a síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada: valina, isoleucina e leucina (KISSMANN, 2014;

POWLES; YU, 2010; TREZZI; VIDAL, 2001). Os herbicidas pertencentes a esse mecanismo de ação atuam inibindo a atividade da enzima ALS, interrompendo a síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, a síntese de proteínas, interferindo no crescimento celular ocasionando a morte da planta (SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002; KISSMANN, 2014). A inibição da atividade da enzima ALS ocorre por uma inibição não competitiva pelo herbicida com o substrato (NICOLAI; CHRISTOFFOLETI; VARGAS, 2008).

Esses herbicidas podem ser empregados em pré e pós-emergência, pois são geralmente móveis tanto no xilema como no floema, podendo ser absorvidos e translocados a partir das folhas e das raízes, acumulando-se nos meristemas de crescimento (OLIVEIRA Jr, 2011; KISSMANN, 2014; NICOLAI; CHRISTOFFOLETI; VARGAS, 2008). A maioria dos herbicidas inibidores da ALS controlam plantas daninha dicotiledôneas, mas alguns herbicidas também exercem controle sobre espécies gramíneas e ciperáceas (TREZZI; VIDAL, 2001).

Os inibidores da ALS surgiram na década de 80 e se tornaram rapidamente populares no meio agrícola, utilizados de forma intensiva em função da elevada eficácia no controle de várias espécies daninhas em baixas doses, baixa toxicidade aos mamíferos e seletividade a várias culturas de grande importância (MONQUEIRO; CHRISTOFFOLETI; DIAS, 2000; OLIVEIRA Jr, 2011). Contudo, o seu uso indiscriminado e contínuo proporcionou, ainda nesta mesma década, o surgimento dos primeiros casos de plantas daninhas resistentes (VIDAL; MEROTTO, 2001). Atualmente, são 156 espécies que possuem biótipos resistentes, dentre as quais a *E. heterophylla*. É o mecanismo de ação que apresenta o maior número de espécies resistentes no mundo, seguido dos inibidores do fotossistema II e da ACCase (HEAP, 2016).

Os países com maior número de espécies resistentes a esse mecanismo de ação são: Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e Brasil, com 48, 25, 25, 21 e 16, respectivamente (HEAP, 2016).

No Brasil, os inibidores da ALS compreendem ao mecanismo de ação com o maior número de espécies resistentes. Biótipos de *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla* foram as primeiras espécies identificadas com resistência, em 1993 (HEAP, 2016). Ao longo dos anos foi detectada resistência em biótipos de: *Bidens*

*subalternans*, *Sagittaria montevidensis*, *Cyperus difformis*, *Fimbristylis miliacea*, *Raphanus sativus*, *Parthenium hysterophorus*, *Oryza sativa* var. *sylvatica*, *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*, *Lolium perenne* ssp. *multiflorum*, *Conyza sumatrensis*, *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus viridis* e, recentemente, biótipos resistentes de *Raphanus raphanistrum* e *Ageratum conyzoides* em 2013 (HEAP, 2016).

O controle do leiteiro em lavouras de soja desde 1986 era realizado principalmente com o emprego de herbicidas inibidores da enzima ALS (VIDAL et al., 2004). A utilização contínua de herbicidas pertencentes a esse mecanismo de ação associada à prática da monocultura da soja no Brasil favoreceu a seleção de um biótipo de *E. heterophylla* com resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS no Rio Grande do Sul (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001) em 1993 (HEAP, 2016).

Levantamentos realizados no Norte do Rio Grande do Sul, Oeste de Santa Catarina, Oeste e Sudoeste do Paraná, evidenciaram ampla disseminação de biótipos de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (FELIPPI et al., 2004; TREZZI et al., 2005; VIDAL et al., 2004; WINKLER; VIDAL, 2004).

#### 1.2.1.1 Mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS

A principal causa da resistência aos inibidores da enzima ALS é a insensibilidade da enzima à ação dos herbicidas (VIDAL, 1997) devido a alteração no gene responsável pela codificação da ALS (DEVINE; SHUKLA, 2000; TRANEL; WRIGHT, 2002). Dessa forma, os herbicidas não conseguem mais provocar a inibição não competitiva, devido à perda da afinidade do herbicida pelo local de ação da enzima, permitindo que a planta resistente produza os aminoácidos mesmo com a presença do herbicida no local de ação (NICOLAI; CHRISTOFFOLETI; VARGAS, 2008). A metabolização do herbicida é relatada como outro mecanismo de resistência possível (POWLES; YU, 2010),

O tipo de mutação responsável por conferir a resistência aos inibidores da ALS foi identificado em: *Sisymbrium orientale* e *Brassica toirnefortii* (BOUTSALIS; KAROTAM; POWLES, 1999), *Lolium rigidum* (YU; HAN; POWLES, 2008),

*Monochoria vaginalis* (WANG et al., 2004), *Alopecurus myosuroides* (DÉLYE; BOUCANSAUD, 2008), *Amaranthus hybridus* (WHALEY; WILSON; WESTWOOD, 2007), entre outras plantas daninhas que totalizam 54 espécies no mundo (TRANEL; WRIGHT; HEAP, 2016).

Estudos avaliando a atividade da enzima ALS verificaram insensibilidade da enzima ao herbicida em *Cyperus difformis* (DAL MAGRO, et al., 2010), *E. heterophylla* com resistência apenas a inibidores da ALS (VARGAS, 2000) e *E. heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS/PROTOX (XAVIER et al., 2013), indicando que o mecanismo de resistência é a modificação no local de ação da enzima ALS.

Os casos de resistência a inibidores da ALS geralmente são conferidos pela ação de um gene dominante, que está presente no núcleo e pode ser transferido via semente ou pólen (TRANEL; WRIGHT, 2002). A resistência de *Sisymbrium orientale* a esse mecanismo de ação é conferida por um único gene nuclear com dominância incompleta (BOUTSALIS; KAROTAM; POWLES, 1999). A resistência de *Lolium multiflorum* aos inibidores da ALS é condicionada por um único gene nuclear com dominância completa (MARIANI et al., 2015), também observado para biótipo de *E. heterophylla* com resistência apenas a inibidores da ALS (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001).

### 1.2.2 Resistência aos Herbicidas Inibidores da PROTOX

A enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX ou PPO) está presente na rota de síntese da clorofila e citocromos, também conhecida como rota de síntese de porfirinas ou tetrapirroles (MEROTTO Jr; VIDAL, 2001), atuando na oxidação do protoporfirinogênio à protoporfirina IX (KISSMANN, 2014; OLIVEIRA Jr, 2011; RIGGINS; TRANEL, 2012). Nas plantas, dois genes nucleares PPX1 e PPX2 codificam as isoformas da enzima PROTOX plastídica e mitocondrial, respectivamente (RIGGINS; TRANEL, 2012).

Estes dois genes são sintetizados no núcleo da célula, no entanto, o gene PPX1 é direcionado para os cloroplastos (plastídios) e o gene PPX2 é possui direcionamento para as mitocôndrias.

A ação herbicida ocorre pela competição com a enzima PROTOX pelo substrato protoporfirinogênio IX impedindo a síntese de protoporfirina IX, resultando no acúmulo de protoporfirinogênio IX no cloroplasto, que se difunde para o citoplasma onde é transformado em protoporfirina IX, que interage com o oxigênio e a luz formando o oxigênio singleto ( $O_2$ ), que desencadeia o processo de peroxidação dos lipídios das membranas celulares, levando a célula à morte (MEROTTO Jr; VIDAL, 2001; SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002; OLIVEIRA Jr, 2011).

Os herbicidas inibidores da PROTOX podem ser absorvidos pelas raízes, caule e folhas, geralmente apresentando pouca ou nenhuma translocação nas plantas e necessitam de luz para serem ativados (MEROTTO Jr; VIDAL, 2001; OLIVEIRA Jr, 2011). A baixa translocação do herbicida na planta se deve aos expressivos danos causados nas células em curto período de tempo (CARVALHO; OVEJERO, 2008).

Quando aplicados em pós-emergência, a ação desses herbicidas é rapidamente visualizada na forma de necrose foliar após 4 a 6 horas de exposição à luz solar e quando aplicados em pré-emergência, a morte da plântula ocorre quando os tecidos entram em contato com o herbicida presente no solo (OLIVEIRA Jr, 2011; SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2002). A alta eficácia desses herbicidas em pós-emergência é alcançada quando aplicados juntamente com adjuvantes, com boa cobertura foliar (CARVALHO; OVEJERO, 2008) e em estágios iniciais de desenvolvimento da planta (MEROTTO Jr; VIDAL, 2001).

Esses herbicidas são amplamente utilizados no controle de plantas daninhas anuais de folhas largas e algumas gramíneas, em que a ação gramínicida é apenas exercida quando em aplicações de pré-emergência (MEROTTO Jr; VIDAL, 2001). São muito importantes no manejo das culturas: da soja, feijão, cana-de-açúcar, algodão, cítrus, café e arroz (CARVALHO; OVEJERO, 2008), sendo também indicados para auxiliar na prevenção da resistência a outros mecanismos de ação (VIDAL; MEROTTO; FLECK, 1999).

A resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX tem evoluído de forma lenta (RIGGINS; TRANEL, 2012). Atualmente existem sete espécies daninhas com resistência a esse mecanismo de ação no mundo (HEAP, 2016). O primeiro caso foi um biótipo de caruru (*Amaranthus tuberculatus* (= *A. rudis*)) identificado no

estado do Kansas (EUA), em 2001 (HEAP, 2016). Em 2004, foi registrado biótipo de leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da PROTOX e da ALS, no estado do Paraná, Brasil (TREZZI et al., 2005). Em 2005, foi identificada resistência envolvendo biótipo de *Ambrosia artemisifolia* no Estado de Delaware (EUA) e de *Amaranthus hybridus* (*syn: quitensis*), na Bolívia. Em 2011, foi identificada resistência a esse mecanismo de ação nas espécies *Descurainia sophia* e *Acalypha australis* na China, e resistência em um biótipo de *Senecio vernalis* foi detectada em Israel, em 2014 (HEAP, 2016).

A resistência múltipla de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS e PROTOX constitui o primeiro caso brasileiro de resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX (HEAP, 2016).

#### 1.2.2.1 Mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da PROTOX

Os mecanismos de resistência são complexos e não são completamente esclarecidos (LERMONTOVA; GRIMM, 2000). Sete diferentes mecanismos de resistência podem estar associados aos inibidores da PROTOX em plantas (DAYAN; DUKE, 1997 apud PATZOLDT et al., 2006), em que a maior degradação metabólica e a alteração do local alvo do herbicida, constituem a maioria dos casos de resistência a esses herbicidas nas espécies daninhas (PATZOLDT et al., 2006).

A superexpressão da enzima PROTOX mitocondrial é responsável por conferir o mecanismo de resistência em *Nicotiana tabacum* (WATANABE et al., 1998) e ao oxyflourfen em *Glycine max* (WARABI et al., 2001), e a superexpressão da PROTOX plastídica em *Nicotiana tabacum* transgênica resistente ao aciflourfen, neutraliza a ação herbicida, evitando a acumulação do protoporfirinogênio IX, e por consequência suprime a fitotoxicidade (LERMONTOVA; GRIMM, 2000). O sequestro do herbicida oxyflourfen é o possível mecanismo de tolerância de *Stellaria media* (MATSUMOTO; KASHIMOTO; WARABI, 1999). A tolerância de *Glycine max* ao herbicida aciflourfen ocorre devido a absorção e translocação menos rápidas e pelo metabolismo mais acentuado da espécie (RITTER; COBLE, 1981). Em mostarda (*Sinapsis alba*) e rabanete (*Raphanus sativus*), a tolerância aos inibidores da

PROTOX é conferida pela degradação (metabolização) do protoporfirinogênio (JACOBS; JACOBS; DUKE, 1996).

A resistência conferida pela metabolização ou detoxificação do herbicida na planta, ocorre devido às enzimas monooxigenases (P-450) e glutathion-a-transferases, que efetuam reações de oxidação e conjugação do herbicida, respectivamente (VIDAL, 2002).

Em biótipos de *Amaranthus tuberculatus* foi, pela primeira vez, elucidado o mecanismo de resistência aos inibidores da PROTOX no local de ação, em que uma mutação no gene (*PPX2L*) que condiciona a enzima PROTOX determina a resistência, governada por um único gene nuclear com dominância incompleta (PATZOLDT et al., 2006). A espécie *A. tuberculatus* apresenta reprodução por fecundação cruzada e o fluxo de pólen constitui um sofisticado meio pelo qual essa espécie pode adaptar-se e evoluir em resposta as tentativas de controle (PATZOLDT et al., 2006).

O segundo caso elucidado de mecanismo de resistência no local de ação da PROTOX foi identificado em *Ambrosia artemisiifolia*. Nesse caso, uma mutação no gene da enzima PROTOX é responsável por conferir a resistência, governada por um único gene com dominância incompleta e nuclear (ROUSONELOS et al., 2012).

Em biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, vários estudos foram realizados investigando o mecanismo de resistência, tais como: metabolização, ação de enzimas detoxificadoras, local de absorção e local de ação (TREZZI et al., 2009; TREZZI et al., 2011b; TREZZI; NUNES; PORTES, 2009; XAVIER et al., 2013). No entanto, ainda não foi elucidado o mecanismo que condiciona a resistência aos inibidores da PROTOX, havendo necessidade do desenvolvimento de novos estudos com esses biótipos.

### 1.2.3 Resistência Múltipla aos Herbicidas

A resistência de plantas daninhas a um mecanismo de ação é um evento raro e a resistência a dois ou mais mecanismos de ação de maneira simultânea é mais raro ainda, já que, a probabilidade desse evento simultâneo

ocorrer é equivalente à multiplicação das probabilidades de ocorrência de cada evento de forma isolada (VIDAL, 1997 apud TREZZI; VIDAL; KRUSE, 2009).

Os casos de resistência múltipla correspondem a mais complexa situação para o manejo de resistência, já que, em algumas culturas, com exceção dos mecanismos de ação que já existe resistência, não há outras alternativas químicas que possam ser utilizadas no controle de determinadas espécies daninhas (OVEJERO; CHRISTOFFOLETI; VARGAS, 2004).

A ocorrência de plantas daninhas resistentes a dois ou mais mecanismos de ação tem aumentado de forma expressiva nos últimos anos, com destaque para *Lolium rigidum* que apresenta resistência múltipla a sete mecanismos de ação (HEAP, 2016). No entanto, existe maior número de casos de resistência múltipla a dois mecanismos de ação (HEAP, 2016), evidentemente em função da maior probabilidade de sua ocorrência.

No Brasil, os casos de resistência múltipla envolvem apenas resistência a dois mecanismos de ação, detectados em: *Euphorbia heterophylla* (ALS e PROTOX), *Bidens subalternans*, *Sagittaria montevidensis*, *Amaranthus retroflexus* e *Amaranthus viridis* (ALS e PSII), *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* (ALS e Auxinas sintéticas), *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (ACCCase e EPSPs) e *Conyza sumatrensis* (ALS e EPSPs) (HEAP, 2016).

No mundo, a resistência múltipla envolvendo herbicidas inibidores da PROTOX foi detectada em biótipos de *Amaranthus tuberculatus* (=A. *rudis*) no Kansas (EUA) em 2001, juntamente com inibidores da ALS, em Illinois (EUA) juntamente com inibidores do fotossistema II e ALS, em 2002, e em 2009 juntamente com inibidores de EPSPs, ALS e fotossistema II, e no estado de Missouri (EUA) com inibidor de EPSPs e ALS em 2005. Em 2004, foi identificado biótipo de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX, no estado do Paraná (Brasil) (TREZZI et al., 2005). Em 2005, foi identificada resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX em *Ambrosia artemisiifolia* no estado de Delaware (EUA) e Ohio em 2006 (EUA), e em 2014 em biótipos de *Senecio vernalis* em Israel, juntamente com mais três mecanismos de ação (HEAP, 2016).

Provavelmente, esses casos de resistência múltipla, são consequência da adoção de herbicidas inibidores da PROTOX como mecanismo de ação alternativo aos inibidores da ALS, e vice-versa, contribuindo para a seleção de resistência a ambos os mecanismos (CARVALHO; OVEJERO, 2008; TREZZI et al., 2005).

A resistência múltipla em *E. heterophylla* constitui o primeiro caso mundial de resistência múltipla nessa espécie (TREZZI et al., 2005) e o primeiro caso brasileiro de resistência a mais de um mecanismo de ação (HEAP, 2016). Essa descoberta gerou bastante apreensão no meio agrícola, já que os principais herbicidas seletivos utilizados para o controle de plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS em pós-emergência da soja são os inibidores da PROTOX (MEROTTO JR; VIDAL, 2001).

### 1.3 FERRAMENTAS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO EM PLANTAS DANINHAS

No processo evolutivo, a mutação gênica é o único meio capaz de criar variabilidade genética, tendo como resultado a formação de novos alelos na população, enquanto que a recombinação genética, hibridação, alterações na estrutura e no número de cromossomos e a migração, apenas ampliam a variabilidade genética já existente (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008).

A integridade da informação genética contida no DNA é mantida devido a vários mecanismos de reparo do DNA: reparo por excisão do nucleotídeo, excisão de bases, reparo de mal pareamento e reparo de quebra de dupla fita, que iniciam durante o processo de replicação e continuam durante o período de pós-replicação. No entanto, um erro que passa despercebido pelos sistemas de reparo resulta em dano permanente no DNA, o que constitui uma mutação (ALBERTS et al., 2010; KARP, 2005; MALACINSKI, 2011).

A mutação é referida como qualquer mudança herdável na sequência do DNA, sendo chamada de mutação espontânea quando ocorre na natureza sem a interferência de um agente mutagênico e, quando, devido à ação de um mutagênico é chamada de mutagênese induzida (MALACINSKI, 2011). As mutações úteis

geralmente são aquelas que promovem pequenas alterações, não sendo grande o suficiente para serem prejudiciais ao organismo (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008).

Um mutante diz respeito a um organismo ou gene que difere do tipo normal (MALACINSKI, 2011). No caso de plantas daninhas resistentes aos herbicidas, os biótipos suscetível e resistente diferem apenas pela presença da mutação que confere a característica da resistência.

Segundo Malacinski (2011), as mutações são classificadas como: mutações por substituição de bases, podendo resultar em mutação neutra, de sentido trocado ou sem sentido; mutações por adição ou deleção de um ou mais pares de bases modificando a matriz de leitura.

Os diferentes tipos de marcadores moleculares existentes diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar o polimorfismo em nível de DNA, e dessa forma, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (MILACH, 2003).

Os marcadores moleculares são amplamente utilizados em análises genéticas com as mais diversas finalidades, tais como identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco, construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2003) e identificação de mutações (VIEIRA, 2007).

Dentre as várias técnicas de análise de polimorfismos no DNA, estão: *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Sequence-Characterized Amplified Regions* (SCAR), *Restriction Fragment Length Polymorphism DNA* (RFLP), DNA Satélite, Minissatélites ou *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), Microssatélites ou *short tandem repeats* (STRs), combinação entre SNPs e STRs/minissatélites (SNPSTR), *Short Interspersed Elements* (SINEs) e Haplóides nos Microssatélites (HAPSR) (SEIXAS, 2011).

O uso da biotecnologia vem se tornando uma técnica cada vez mais utilizada dentro da ciência das plantas daninhas, visando elucidar os mecanismos de resistência (ROSO; VIDAL, 2010). Através dela é possível estimar a variabilidade

genética dentro e entre espécies, servir como ponto de partida para estudos relacionados ao manejo das plantas infestantes e quando aliada ao sequenciamento genético é possível localizar genes de resistência e possíveis mutações relacionadas ao surgimento de indivíduos resistentes (VIEIRA, 2007).

Além disso, as ferramentas biotecnológicas têm contribuído para o controle das plantas daninhas através do desenvolvimento e comercialização de plantas cultivadas munidas de resistência a determinados herbicidas (TRANEL; HORVATH, 2009).

### 1.3.1 Bases Moleculares da Resistência aos Inibidores da ALS

O sítio catalítico da enzima ALS é profundo no interior de um canal, impossibilitando a ligação dos herbicidas. Dessa forma, as moléculas de herbicida ligam-se através de um domínio de ligação que atravessa a entrada do canal, bloqueando o acesso do substrato ao sítio catalítico enzimático (POWLES; YU, 2010). Através deste domínio, 18 aminoácidos diferentes encontram-se envolvidos na ligação do herbicida (McCOURT et al., 2006), sendo que os herbicidas apresentam estruturas diferentes e por esse motivo, uma substituição de um aminoácido específico no domínio de ligação pode conferir resistência para alguns herbicidas, mas para outros não (POWLES; YU, 2010).

As mutações evitam a ligação dos herbicidas à enzima ALS que mantém sua atividade funcional devido ao sítio de ligação dos herbicidas ser separado do sítio catalítico enzimático, ou seja, pelos herbicidas se ligarem longe do sítio catalítico (PANG; GUDDAT; DUGGLEBY, 2003; POWLES; YU, 2010).

A enzima ALS apresenta elevada conservação entre as espécies (CHIPMAN; BARAK; SCHLOSS, 1998; GUTTIERI et al., 1996), no entanto diferem no seu comprimento em pares de bases, pelo fato de não conservarem as adições e deleções de nucleotídeos, que por esse motivo as posições das regiões de consenso (sequência de nucleotídeos idêntica) na enzima ALS, muitas vezes variam entre as espécies (TRANEL; WRIGHT, 2002). Na maioria das espécies não tem sido encontrado *introns* (regiões não codificantes de RNAm) nos genes da enzima ALS sequenciados (SCARABEL et al., 2004; TRANEL; WRIGHT, 2002).

Na maioria dos casos, as plantas daninhas desenvolveram resistência a esse mecanismo de ação devido a uma mutação no gene que codifica a enzima ALS (TRANEL; WRIGHT, 2002), caracterizando a resistência no sítio alvo, que ocorre em função da substituição de um aminoácido por outro (SHANER, 1999) em vários locais ao longo do gene ALS (WHALEY; WILSON; WESTWOOD, 2007). As diferentes mutações relatadas na literatura conferindo a resistência aos inibidores da ALS foram identificadas dentro de cinco regiões altamente conservadas (domínios) do gene ALS (BOUTSALIS; KAROTAM; POWLES, 1999; TRANEL; WRIGHT, 2002) denominadas de A, B, C, D e E que variam no tamanho, 12 a 57 pares de bases (RIZZARDI et al., 2002).

As descobertas realizadas até o momento evidenciam a existência de oito mutações na enzima ALS, com substituição dos aminoácidos: Pro<sub>197</sub>, Trp<sub>574</sub>, Ala<sub>122</sub>, Asp<sub>376</sub>, Ser<sub>653</sub>, Ala<sub>205</sub>, Gly<sub>654</sub> e Arg<sub>377</sub>, por outros aminoácidos, em: 34, 32, 8, 7, 7, 6, 2 e 1 espécies daninhas, respectivamente, com destaque para Pro<sub>197</sub> que é substituída por 10 aminoácidos diferentes e a substituição de Trp<sub>574</sub>Leu constatada em 31 espécies diferentes (HEAP, 2016). Isso sugere que Pro<sub>197</sub> e Trp<sub>574</sub> são locais na enzima ALS mais propensos à ocorrência de mutações.

A substituição de Pro<sub>197</sub>Thr em *Kochia scoparia*, desvendada em 1990, constitui o primeiro caso elucidado de mutação conferindo resistência aos inibidores da ALS (HEAP, 2016), sendo posteriormente elucidadas muitas outras mutações conferindo resistência a esse mecanismo de ação.

Em *E. heterophylla* resistente apenas a inibidores da ALS a característica de resistência é conferida por uma modificação na enzima ALS (VARGAS et al., 1999), porém, a mutação ainda não foi desvendada.

Até o momento, os estudos com *E. heterophylla* permanecem superficiais, havendo necessidade de estudos mais aprofundados em nível molecular, para desvendar a mutação que confere resistência cruzada aos inibidores da ALS e se a resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX são devidas a mutações nas enzimas ou a outros mecanismos.

### 1.3.2 Bases Moleculares da Resistência aos Inibidores da PROTOX

A enzima PROTOX está presente nos cloroplastos e nas mitocôndrias (WATANABE et al., 2001 apud TREZZI; NUNES; PORTES, 2009). Dois diferentes genes nucleares, *PPX1* e *PPX2* codificam a enzima PROTOX no plastídio e na mitocôndria, respectivamente (LEE; HAGER; TRANEL, 2008; POWLES; YU, 2010).

Em *A. tuberculatus* resistente a inibidores da PROTOX, foi constatada a deleção do aminoácido Gly<sub>210</sub> no gene *PPX2L* como sendo responsável por conferir a resistência (PATZOLDT et al., 2006), constituindo o primeiro caso de mutação na enzima PROTOX elucidada em plantas daninhas. Esta deleção de Gly<sub>210</sub> em *A. tuberculatus* é o único relato de deleção de um códon conferindo resistência aos herbicidas em plantas daninhas (LEE; HAGER; TRANEL, 2008; POWLES; YU, 2010) e equivale à deleção do aminoácido Gly<sub>178</sub> em *N. tabacum* (PATZOLDT et al., 2006). Esta deleção de Gly<sub>210</sub> também foi encontrada conferindo a resistência ao PROTOX em *A. tuberculatus* com resistência múltipla a quatro mecanismos de ação (BELL; HAGER; TRANEL, 2013).

A eliminação do códon em *A. tuberculatus*, ocorreu em uma região de sequências simples repetidas (SSRs) (DAYAN et al., 2014) que são locos altamente mutáveis (KASHI; KING, 2006; OLIVEIRA, 2006) em que um códon pode ser eliminado através do deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase (DAYAN et al., 2014) durante o processo de replicação ou reparo do DNA (STRAND et al., 1993). Estudo envolvendo a estrutura do gene *PPX2* de *N. tabacum* revelou que a deleção de Gly<sub>210</sub> proporcionou aumento do volume do sítio ativo da enzima PROTOX, causando um rearranjo estrutural do domínio de ligação ao substrato protoporfirinogênio (POWLES; YU, 2010).

Em geral, a deleção de um aminoácido é considerada um evento muito mais raro evolutivamente de ocorrer ( $\sim 10^{-18}$ ) do que um evento de substituição ( $\sim 10^{-9}$ ) (GRESSEL; LEVY, 2006). Esse mecanismo de resistência (deleção) demonstra que a elevada pressão de seleção imposta pelo herbicida pode revelar genes de resistência muito raros e inesperados (POWLES; YU, 2010), assim como, a capacidade das plantas daninhas evoluírem em resposta a tais pressões de seleção (TRANEL; HORVATH, 2009).

Em *A. artemisiifolia* resistente a inibidores da PROTOX, uma mutação também encontrada no gene *PPX2* com substituição do aminoácido Arg<sub>98</sub>Leu é

responsável por conferir a resistência a esse mecanismo de ação (ROUSONELOS et al., 2012), constituindo o segundo caso de mutação elucidado envolvendo essa enzima. Na comparação de sequências de *A. artemisiifolia* e *A. tuberculatus* foi constatado que *A. artemisiifolia* não apresenta uma região repetida de microssatélites homóloga a deleção da Gly<sub>210</sub>, não havendo predisposição para tal mutação, enquanto que *A. tuberculatus* apresenta um códon de arginina diferente na posição 98, de modo que a ocorrência de uma mutação no aminoácido Arg<sub>98</sub> necessitaria a substituição de dois nucleotídeos (ROUSONELOS et al., 2012).

Os herbicidas inibidores da enzima PROTOX possuem dois locais de destino nas plantas, nos plastídios e nas mitocôndrias (JACOBS; JACOBS, 1984 apud PATZOLDT et al., 2006). Dessa forma, para que a resistência no local alvo ocorra, dois genes precisariam ser selecionados pelos herbicidas (PATZOLDT et al., 2006). No entanto, foi comprovado que a alteração em um único gene *PPX2* para *A. tuberculatus* e *A. artemisiifolia* é suficiente para conferir a característica de resistência aos inibidores da PROTOX (PATZOLDT et al., 2006; ROUSONELOS et al., 2012). Isso é possível, pois as proteínas codificadas nuclearmente podem apresentar duplo direcionamento (MACKENZIE, 2005). Neste caso o gene *PPX2* é direcionado para o cloroplasto e para a mitocôndria. Assim a enzima PROTOX resistente (gene *PPX2*) funciona tanto no cloroplasto quanto na mitocôndria (LEE; HAGER; TRANEL, 2008).

Segundo Powles e Yu (2010), a necessidade da deleção de um códon no gene e que o produto deste gene tenha um duplo direcionamento para os cloroplastos e mitocôndrias deve limitar a evolução desta deleção como mecanismo de resistência.

Na comparação de sequências do gene *PPX2* de várias espécies de *Amaranthus* foi constatado que *A. tuberculatus* pode ter sido predisposto à evolução deste mecanismo de resistência devido à presença de uma sequência simples repetida no local da mutação e que a sua ausência em outras espécies de *Amaranthus* justifica o fato da resistência aos inibidores da PROTOX não ter se tornado mais comum, mesmo com a elevada pressão de seleção imposta pelo herbicida (RIGGINS; TRANEL, 2012). No entanto, *A. palmeri* S. Watson apresenta predisposição para desenvolver resistência aos inibidores da PROTOX através da

deleção do aminoácido Gly<sub>210</sub>, pois apresenta uma sequência simples repetida no local da mutação observada em *A. tuberculatus* (RIGGINS; TRANEL, 2012).

Até o presente momento, das sete espécies daninhas com resistência aos inibidores da PROTOX o mecanismo de resistência apenas foi elucidado em *A. tuberculatus* e *A. artemisiifolia* como sendo uma mutação na enzima com deleção e substituição de aminoácido, respectivamente. No entanto, nas demais espécies, incluindo *E. heterophylla*, os estudos permanecem superficiais.

### 1.3.3 Transferibilidade de Iniciadores SSR

O genoma dos eucariotos é rico em sequências simples repetidas de um a seis nucleotídeos repetidos (motivo) em *tandem* (sequência) ao longo do genoma, denominados de microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) (BORÉM; CAIXETA, 2006; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LITT; LUTY, 1989; OLIVEIRA, 2006).

Os microssatélites podem ser classificados em perfeitos quando não há presença de outras bases nas repetições (TATATATATATA), imperfeitos quando outras bases não pertencentes as do motivo estão presentes dentro das repetições (TATATAGTATATA) e compostos, quando a sequência apresenta dois motivos diferentes repetidos (TATATACGCGCG) (OLIVEIRA et al., 2006).

Os SSR estão presentes no genoma em regiões codificadoras (exons) e regiões não codificadoras (introns) (OLIVEIRA, 2006), caracterizados pelo alto polimorfismo decorrente das elevadas taxas de mutação presentes nesses locos (JARNE; LAGODA, 1996; OLIVEIRA, 2006). Essas taxas de mutação variam de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco por região (SCHLOTTERER, 2000) e estão relacionadas aos erros que ocorrem durante os processos de recombinação, crossing-over desigual e deslizamento (*slippage*) da polimerase durante o processo de replicação ou reparo do DNA (STRAND et al., 1993).

Os marcadores SSR (sequências simples repetidas) são largamente empregados devido a: alta disponibilidade, repetibilidade, polimorfismo (RITSCHER et al., 2004; VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005), necessidade de pequenas quantidades de DNA para análise de PCR (RITSCHER et al., 2004) e por apresentar

carácter codominante (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005), que possibilita a identificação de plantas heterozigotas em análises de populações segregantes, pois geram banda para o alelo dominante e para o alelo recessivo.

A confecção de marcadores demanda grande quantidade de trabalho, tempo e aporte financeiro (JONES et al., 2009). Uma alternativa em relação a isso é a transferibilidade de marcadores moleculares desenhados em determinada espécie para estudos em espécies filogeneticamente relacionadas (BÁRBARA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006; SANTANA, 2014).

Isso é possível, pois as sequências de DNA que flanqueiam as sequências simples repetidas geralmente são conservadas dentro da mesma espécie (OLIVEIRA, 2006), entre espécies diferentes ou até mesmo entre diferentes gêneros (PINTO, 2007) possibilitando a seleção e utilização de iniciadores para amplificação de regiões genômicas de espécies pertencentes a mesma família.

Dessa forma, a transferibilidade de marcadores viabiliza o desenvolvimento de estudos em plantas daninhas, em que, para muitas das espécies estudadas não há informações genéticas e moleculares (GOULART et al., 2011), como é o caso de *Euphorbia heterophylla*.

Em espécies pertencentes ao mesmo gênero, o percentual de transferibilidade em dicotiledôneas é de 60% (SANTANA, 2014) e entre espécies de gêneros diferentes, mas pertencentes a mesma família é cerca de 10% (BÁRBARA et al., 2007).

O potencial de transferibilidade está relacionado com o grupo taxonômico e vários outros fatores (SANTANA, 2014), mas quanto maior o grau de parentesco entre as espécies, maior será o percentual de marcadores transferidos (BÁRBARA et al., 2007; PINTO, 2007; PRIMMER; MERILÄ, 2002). O tamanho, a complexidade do genoma e a localização do microssatélite (quando em região codificante aumenta a transferibilidade e diminui em não codificante) também influenciam a transferibilidade (OLIVEIRA et al., 2006).

#### 1.3.4 Protocolos de Extração de DNA

O processo de extração de DNA constitui o primeiro passo para o desenvolvimento da maioria das metodologias de biologia molecular (GOUVEIA; REGINATO, 2007). A extração e a purificação de ácidos nucleicos é uma etapa fundamental para a obtenção de alta eficiência de amplificação nos protocolos que envolvem a utilização de PCR (OLIVEIRA et al., 2007). Segundo Chen et al. (2010), o protocolo ideal é aquele que otimiza o rendimento de DNA extraído, minimiza a degradação e apresenta eficiência em termos de trabalho, custo e tempo.

Dois processos estão envolvidos na extração de DNA, a extração propriamente dita através do rompimento das membranas celulares com exposição do material genético e a purificação do DNA em solução com remoção dos outros componentes celulares da solução, como restos de membrana, proteínas e RNA (ROMANO, 1999).

Muitos problemas verificados no isolamento e purificação de DNA vegetal são decorrentes, principalmente do co-isolamento de proteínas, polissacarídeos, compostos secundários e substâncias fenólicas (MAZZA; BITTENCOURT, 2000). Muitas espécies contêm compostos fenólicos envolvidos na defesa contra herbivoria (MAZZA; BITTENCOURT, 2000), como é o caso do leiteiro (*E. heterophylla*), em que a produção de látex esbranquiçado é abundante, podendo ser observado nas partes florais e vegetativas (CRONQUIST, 1981). O látex é responsável por ocasionar problemas na extração de DNA de boa qualidade, devido à contaminação por compostos fenólicos (ROSO; VIDAL, 2010) que são liberados durante a lise celular aderindo ao DNA de forma irreversível, inibindo a amplificação via PCR (COUCH; FRITZ, 1990).

A utilização de fenol, aumento da concentração de  $\beta$ -Mercaptoetanol e uso de Polivinilpirrolidona (PVP) junto ao tampão de extração, têm sido empregado nos protocolos de extração como alternativas para evitar o efeito oxidativo dos polifenóis (ROMANO; BRASILEIRO, 1999; ROSO; VIDAL, 2010).

Na literatura são encontrados poucos estudos em nível molecular envolvendo a espécie *E. heterophylla*, os quais empregaram métodos de extração baseados em Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) com presença ou ausência de fenol e  $\beta$ -Mercaptoetanol (AMARAL, 2006; WINKLER; VIDAL, 2004; WINKLER;

VIDAL; NETO, 2003), no entanto, não houve relato das quantidades e da qualidade do DNA obtidos nestes estudos.

Apenas um único protocolo de extração foi adaptado para essa espécie (ROSO; VIDAL, 2010), em que os autores observaram que apenas um dos três protocolos de extração testados resultou em quantidade e qualidade adequada do DNA extraído.

Os kits comerciais de extração de DNA são rápidos, mas de custo elevado, além de gerar grandes quantidades de resíduos contaminantes, enquanto que protocolos de extração caseiros são baratos e muito eficientes, mas geralmente, o processo de preparação é lento (MEGA; REVERS, 2011). Determinados protocolos utilizam produtos altamente tóxicos, voláteis, cancerígenos e mutagênicos, como é o caso de métodos baseados em fenol (MEGA; REVERS, 2011), que podem ser substituídos por métodos baseados em detergente catiônico Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) que são capazes de fornecer amostras de DNA de boa qualidade utilizando produtos menos perigosos (MOELLER et al., 1992), reduzindo assim os riscos à saúde do pesquisador e ao meio ambiente.

Dessa forma, é de grande importância o desenvolvimento de estudos visando a otimização da extração de DNA de *E. heterophylla*, que proporcionam grande quantidade de DNA extraído e com alta qualidade, que não ocasionem problemas na reação de PCR.

## 2 HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX EM *Euphorbia heterophylla* L.

### 2.1 RESUMO

O surgimento de *E. heterophylla* com resistência a mais de um mecanismo de ação representa um caso complexo e de difícil solução que gera preocupação na agricultura. O conhecimento da herança genética é de grande importância para a compreensão do surgimento e da evolução da resistência, permitindo definir estratégias de manejo adequadas para o controle de populações resistentes, evitando ou retardando o seu surgimento. O presente trabalho objetivou estudar a herança genética da resistência de *E. heterophylla* aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX. Foram realizados cruzamentos entre biótipo suscetível (genitor feminino) e com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX (genitor masculino). Em seguida, foram realizados retrocruzamentos ( $RC_s$  e  $RC_r$ ) e a geração  $F_1$  foi avançada para  $F_2$ . Plantas das gerações  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_s$ ,  $RC_r$  e os genitores foram submetidos à aplicação do herbicida fomesafen (250 g i.a.  $ha^{-1}$ ) e imazethapyr (100 g i.a.  $ha^{-1}$ ). A dominância completa da resistência foi avaliada através de curvas de resposta a doses, em que plantas heterozigotas  $F_1$  e dos genitores homozigoto resistente e suscetível, foram submetidas às doses de: 0, 62,5, 125, 250, 500, 1000 e 2000 g i.a.  $ha^{-1}$  de fomesafen e 0, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 g i.a.  $ha^{-1}$  de imazethapyr. As frequências observadas na geração  $F_2$  para resistência múltipla não diferiram de 9:3:3:1 e de 3:1 para a resistência simples ao PROTOX e ALS. Todos os indivíduos do  $RC_r$  foram resistentes enquanto a população do  $RC_s$  apresentou segregação que não diferiu da frequência 1:1:1:1 para resistência múltipla e 1:1 para resistência simples. Níveis similares de resistência entre o heterozigoto  $F_1$  e o biótipo homozigoto resistente para doses de até 800 g i.a.  $ha^{-1}$  de imazethapyr e 2000 g i.a.  $ha^{-1}$  de fomesafen, confirmam a dominância completa da resistência aos inibidores da ALS e PROTOX, respectivamente. Com isso, conclui-se que a resistência múltipla de *E. heterophylla* é condicionada por dois genes nucleares, com dominância completa e que a resistência simples tanto aos inibidores da ALS quanto da PROTOX é determinada por um único gene nuclear e dominante, com dominância completa.

## 2.2 ABSTRACT

The emergence of *E. heterophylla* resistant to more than one mechanism of action is a complex case and difficult solution that generates a lot of concern in agriculture. Knowledge of the genetic inheritance is of great importance for understanding the starting and evolution of resistance in order to define suitable management strategies for the control of resistant populations, preventing or delaying the new cases of resistance. This study aimed to assess the genetic inheritance of *E. heterophylla* ALS- and PROTOX-inhibiting herbicides. Crosses were carried out between susceptible (female parent) and multiple resistance to ALS inhibitors and PROTOX (male parent). Then, backcrossing were conducted ( $RC_s$  and  $RC_r$ ) and the  $F_1$  generation advanced to  $F_2$ .  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_s$ ,  $RC_r$  generation plants and their parents were submitted to the fomesafen (250 g i.a.  $ha^{-1}$ ) and imazethapyr (100 g i.a.  $ha^{-1}$ ). The complete dominance resistance was evaluated by dose response curves, what plants heterozygous  $F_1$  and resistant homozygous parents and susceptible were subjected to doses of: 0, 62,5, 125, 250, 500, 1000 and 2000 g i.a.  $ha^{-1}$  of fomesafen and 0, 25, 50, 100, 200, 400 and 800 g i.a.  $ha^{-1}$  of imazethapyr. The frequencies observed in the  $F_2$  generation for multiple resistance did not differ 9:3:3:1 and 3:1 for simple resistance PROTOX and ALS. All  $RC_r$  individuals were resistant while  $RC_s$  population showed segregation whose frequency was not different from 1:1:1:1 for multiple resistance and 1:1 for simple resistance. Similar levels of resistance between heterozygous  $F_1$  and homozygous resistant biotype at doses up to 800 g i.a.  $ha^{-1}$  imazethapyr and 2000 g i.a.  $ha^{-1}$  fomesafen, confirm the complete dominance of resistance to ALS- and PROTOX-inhibiting herbicides, respectively. We concluded that the multiple resistance of *E. heterophylla* is due to two nuclear genes with complete dominance and the simple resistance to ALS- and PROTOX-inhibiting herbicides is determined by a single dominant nuclear gene with complete dominance.

## 2.3 INTRODUÇÃO

Em vários países do mundo, a resistência aos herbicidas em plantas daninhas é um problema crescente e de difícil solução. No ano de 2004, na região Sudoeste do Paraná, Brasil, foi constatado o primeiro caso de resistência a mais de um mecanismo de ação no Brasil, de um biótipo de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX (TREZZI et al., 2005).

Plantas de *E. heterophylla* com resistência a mais de um mecanismo de ação significam um grave problema para a agricultura, pois o número de alternativas químicas que podem ser usadas para o controle são reduzidas, aumentando a complexidade do manejo, as perdas de rendimento, os riscos de impacto ambiental e dificultando a obtenção de soluções. A capacidade competitiva do leiteiro é muito elevada, podendo ocasionar perdas no rendimento de grãos que chegam até 60% na cultura do feijão (MACHADO et al., 2015) e 38,4% na cultura da soja (MESCHEDE et al., 2004).

A herança genética da resistência aos inibidores da enzima ALS foi estudada em várias espécies daninhas, entre elas a *E. heterophylla* (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001). Geralmente, a herança genética da resistência a esse mecanismo de ação é determinada por um único gene presente no núcleo (TRANEL; WRIGHT, 2002), com dominância completa (MARIANI et al., 2015; VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001) ou incompleta (BOUTSALIS; POWLES, 1995).

Estudos da herança genética da resistência aos inibidores da PROTOX foram apenas desenvolvidos em *A. tuberculatus* e *A. artemisiifolia*, e têm revelado que a resistência a esse mecanismo de ação é condicionado por um único gene nuclear com dominância incompleta (PATZOLDT et al., 2006; ROUSONELOS et al., 2012).

O conhecimento da herança genética permite compreender o surgimento e a evolução da resistência, e a partir disso, adotar técnicas de manejo adequadas para o controle de populações resistentes e evitar ou retardar o surgimento de novas populações resistentes (CHRISTOFFOLETI; FILHO; SILVA, 1994).

O presente trabalho objetivou estudar a herança genética da resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX em *E. heterophylla*, visando

elucidar o número de genes, o modo de herança e os efeitos gênicos envolvidos nas resistências.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação equipada com sistema de refrigeração do tipo cortina de pedra e aquecedor automático mantendo temperatura entre 23 °C e 28 °C e, em estufa pertencente ao Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco.

### 2.4.1 Obtenção dos Biótipos

As sementes dos biótipos utilizados na determinação da herança genética são oriundas de lavouras do Sudoeste do Paraná, sendo o biótipo suscetível (S) oriundo do município de Renascença e o biótipo resistente (R) oriundo do município de Vitorino. O biótipo S apresenta suscetibilidade aos herbicidas inibidores da ALS e PROTOX, e o biótipo R apresenta resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX.

Os biótipos foram obtidos a partir de uma coleta em bulk de sementes de 20 plantas de *E. heterophylla* dispostas aleatoriamente em lavouras de soja (TREZZI et al., 2005). Após a semeadura as plantas originadas foram submetidas a sucessivas autofecundações com seleção do biótipo S e R a cada geração de autofecundação, por meio da aplicação dos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX.

### 2.4.2 Teste Preliminar Frente aos Herbicidas Inibidores da ALS e PROTOX

Na comprovação da resistência e suscetibilidade dos biótipos foi realizado um teste preliminar através da aplicação do inibidor da PROTOX e sete dias após, aplicação do inibidor da ALS no biótipo R, assim como para o biótipo S. Utilizou-se como inibidor da PROTOX o herbicida fomesafen (250 g i.a. ha<sup>-1</sup>) sempre associado ao espalhante adesivo não iônico/aniônico, com produto comercial

denominado ENERGIC, na concentração de 0,2% v/v (200 mL para cada 100 Litros de calda) e como inibidor da ALS o imazethapyr (100 g i.a. ha<sup>-1</sup>). A aspersão foi realizada utilizando-se pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub>, empregando-se uma barra de três pontas tipo leque 110.02, espaçadas de 0,5 m e com volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>.

#### 2.4.3 Realização dos Cruzamentos e Retrocruzamentos Entre os Biótipos

Os biótipos foram semeados em seis vasos com capacidade para 5 litros, contendo substrato para plantas (Húmus Fértil®). Após a emergência das plantas, efetuou-se o desbaste deixando apenas duas plantas por vaso, visando um maior desenvolvimento das mesmas com formação de maior número de ramos e maior número de flores, dessa forma permitindo maximizar os cruzamentos. Durante todo o período de realização dos cruzamentos e retrocruzamentos as plantas permaneceram em casa de vegetação com temperatura entre 23 °C e 28 °C.

Os cruzamentos e retrocruzamentos foram realizados entre os estádios 2 a 4 de desenvolvimento da flor (ANEXO A), pois, nesse momento se obtém a melhor taxa de fecundação, além de elevar a probabilidade de formação de 3 sementes por ciátio (VARGAS; BORÉM; SILVA, 1999).

A partir do momento em que as plantas emitiram conjuntos de inflorescências, os mesmos foram isolados com tecido visando evitar polinizações indesejadas por insetos. O tecido também teve utilidade para a coleta de sementes, já que, o leiteiro apresenta deiscência explosiva, ou seja, quando as sementes estão maduras, as cápsulas que as contêm se abrem lançando-as para longe da planta mãe.

As flores foram emasculadas e em seguida polinizadas ainda no mesmo dia e preferencialmente depois do meio dia, horário em que a liberação de pólen é mais pronunciada. O processo de polinização foi realizado até o momento que se comprovou a fecundação, observada em função da curvatura do pedicelo. Os cruzamentos foram realizados entre o biótipo S (genitor feminino) e o biótipo R (genitor masculino) sem o recíproco, de forma a obter a geração F<sub>1</sub>.

Após a obtenção da geração  $F_1$  realizou-se o retrocruzamento suscetível ( $RC_s$ ) entre plantas  $F_1$  e o biótipo S, e retrocruzamento R ( $RC_r$ ) entre plantas  $F_1$  e o biótipo resistente. Além disso, conduziu-se a geração  $F_1$  para a obtenção da geração segregante  $F_2$ .

#### 2.4.4 Etapa de Fenotipagem

As gerações  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_s$ ,  $RC_r$  e os genitores S e R foram semeados em 30 bandejas de 128 células, contendo substrato de plantas (Húmus Fértil®) para a avaliação da reação aos herbicidas. Para garantir adequada nutrição das plantas foram realizadas adubações no substrato com fertilizante comercial VitaPlan® com formulação 4-14-08, respectivamente, para teores de N,  $P_2O_5$  e  $K_2O$ .

A aplicação normal dos herbicidas foi realizada de forma sequencial, em que o inibidor da PROTOX foi aplicado inicialmente e após 7 dias foi aplicado o inibidor da ALS. A aplicação do herbicida inibidor da PROTOX foi realizada quando as plantas encontravam-se no estágio de duas folhas cotiledonares mais duas verdadeiras, e até quatro folhas verdadeiras para o inibidor da ALS. Para o inibidor da PROTOX utilizou-se o herbicida fomesafen ( $250 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ ) e para o inibidor da ALS o herbicida imazethapyr ( $100 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ ). Utilizou-se um volume de calda de  $200 \text{ L.ha}^{-1}$  com aspersão realizada por um pulverizador costal pressurizado a  $CO_2$  empregando-se uma barra de pontas de pulverização espaçadas de 0,5 m com bicos do tipo leque 110.02.

Uma população segregante de  $F_2$  e  $RC_s$  foi submetida à aplicação dos herbicidas em ordem inversa à aplicação descrita anteriormente, em que o herbicida imazethapyr foi aplicado em primeiro lugar, quando as plantas apresentavam duas folhas cotiledonares mais duas verdadeiras e, em sequência, o herbicida fomesafen aos 21 dias após aplicação (DAA) do inibidor da ALS, momento em que as plantas apresentavam duas folhas cotiledonares e quatro folhas verdadeiras. Essa aplicação permitiu a identificação do número de plantas resistentes ao ALS, já que na aplicação na ordem normal (antes fomesafen e depois imazethapyr) essas plantas morreram juntamente com as plantas suscetíveis aos inibidores da PROTOX. Além

disso, permitiu verificar se as proporções fenotípicas obtidas através das duas formas de aplicação dos herbicidas atenderam à proporção esperada.

A fenotipagem foi realizada individualmente, para cada planta, avaliando-se o nível de controle proporcionado pelo herbicida, através da escala de avaliação de controle e injúria proposta por Frans et al. (1986), em que o nível de controle varia de 0-100%. Os indivíduos foram considerados resistentes quando o nível de controle situou-se entre 0-40% e suscetíveis entre 60-100%.

As avaliações do nível de controle pelo fomesafen foram realizadas aos 7 DAA devido ao rápido desenvolvimento dos sintomas na planta, e pelo imazethapyr aos 21 DAA, pois a manifestação dos sintomas ocorre mais lentamente.

As populações de plantas R, S, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>s</sub> e RC<sub>r</sub> avaliadas no primeiro cruzamento foram de 53, 22, 25, 198, 30 e 35, no segundo foram de 42, 48, 27, 184, 20 e 30 e no terceiro de 53, 40, 23, 82, 15 e 29, respectivamente. As populações de plantas F<sub>2</sub> e RC<sub>s</sub> submetidas à aplicação dos herbicidas em ordem inversa no primeiro cruzamento foram de 180 e 25, no segundo de 71 e 14 e no terceiro de 210 e 16, respectivamente.

#### 2.4.4.1 Obtenção das proporções fenotípicas nas gerações segregantes F<sub>2</sub> e RC<sub>s</sub>

A proporção de plantas segregantes para o gene PROTOX foi obtida a partir da aplicação do herbicida fomesafen no modo de aplicação normal e, a proporção de plantas com resistência simples ao PROTOX e com resistência múltipla aos ALS/PROTOX, foi obtida através da aplicação sequencial do herbicida imazethapyr.

A proporção de plantas segregantes para o gene ALS foi obtida através da aplicação do herbicida imazethapyr no modo de aplicação inversa e, a proporção de plantas com resistência simples ao ALS e com resistência múltipla ao ALS/PROTOX, foi obtida a partir da aplicação sequencial do herbicida fomesafen.

O número de plantas R e S ao inibidor da ALS obtidas através do modo de aplicação normal e, o número de plantas R e S ao inibidor da PROTOX obtidas a partir do modo de aplicação inversa foram estimados de acordo com a hipótese de segregação levantada para o número de genes envolvidos na resistência.

#### 2.4.5 Curva de Resposta à Dose

Dois experimentos de curva de resposta à dose foram conduzidos em estufa plástica pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco, para avaliar a dominância da resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da PROTOX e da ALS. O delineamento experimental foi bifatorial 3x7 inteiramente casualizado do tipo qualitativo x quantitativo com 5 repetições com uma planta por repetição, sendo 3 biótipos (suscetível, resistente e heterozigoto F<sub>1</sub>) e 7 doses para o inibidor da PROTOX 0x, 0,25x, 0,50x, 1x, 2x, 4x e 8x em relação à dose comercial, equivalentes à 0, 62,5, 125, 250, 500, 1000 e 2000 g i.a. ha<sup>-1</sup> de fomesafen. As 7 doses para o inibidor da ALS foram constituídas de 0x, 0,25x, 0,50x, 1x, 2x, 4x e 8x em relação à dose comercial, equivalentes à 0, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 g i.a. ha<sup>-1</sup> de imazethapyr.

Para ambos os experimentos, as sementes do biótipo homozigoto resistente e suscetível e a geração heterozigota F<sub>1</sub>, inicialmente foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2%, por 5 minutos, e em seguida pré-emergidas em placas do tipo gerbox contendo papel germitest umedecido com água, mantidas em estufa incubadora BOD à 29 °C, com fotoperíodo durante dia e noite por 5 dias. As plântulas uniformes, entre 3 e 5 cm foram transplantadas para vasos com capacidade de 5 litros. No momento em que as plantas apresentaram duas folhas verdadeiras e duas cotiledonares, procedeu-se a aplicação dos herbicidas.

A aplicação dos herbicidas e a fenotipagem foram realizadas da mesma forma descrita no item 2.2.4. A avaliação do nível de controle para o herbicida fomesafen foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA) e, aos 21 DAA as plantas foram cortadas rente ao solo e submetidas à pesagem para a determinação da matéria verde e matéria seca. Para o herbicida imazethapyr, o nível de controle foi avaliado aos 7, 14, 21 e 28 DAA e, aos 28 DAA, as plantas foram cortadas rente ao solo e pesadas para a determinação das matérias verde e seca.

#### 2.4.6 Análises Estatísticas

#### 2.4.6.1 Estimativa do número de genes

O número de genes envolvidos nas resistências e a independência dos genes foram determinados a partir da análise das distribuições de frequência fenotípica. Os modelos de distribuição de frequência 9:3:3:1, 1:1:1:1, 3:1 e 1:1 foram testados pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), utilizando o programa computacional Genes (CRUZ, 2013), para confirmar a hipótese de que dois genes estariam envolvidos na resistência múltipla e um gene na resistência simples aos inibidores da ALS e PROTOX.

#### 2.4.6.2 Componentes das variâncias

A variância fornece a média aproximada das diferenças ao quadrado entre cada uma das observações e a média aritmética, ou seja, o desvio do quadrado médio da média. Assim, a variância indica a variabilidade de um grupo de médias ou o quanto a distribuição é espalhada em torno da média.

Os efeitos genéticos foram obtidos através dos componentes da variância, calculados a partir das variâncias ( $\sigma^2$ ) das gerações S, R, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>s</sub> e RC<sub>r</sub>, pelas fórmulas propostas por Ramalho, Santos e Pinto (2008), com o auxílio do software Libre Office Calc (LIBRE OFFICE, 2013):

$$\sigma_E^2 = \frac{\sigma_{P1}^2 + \sigma_{P2}^2 + \sigma_{F1}^2}{3}$$

$$\sigma_A^2 = (2 \cdot \sigma_{F2}^2) - (\sigma_{RCs}^2 + \sigma_{RCr}^2)$$

$$\sigma_D^2 = \sigma_{F2}^2 - \sigma_A^2 - \sigma_E^2$$

$$\sigma_G^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2$$

$$\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$$

Onde:

$\sigma_E^2$  = Variância ambiental;

$\sigma_{P1}^2$  = Variância da geração suscetível (S);

$\sigma_{P2}^2$  = Variância da geração resistente (R);

$\sigma_{F1}^2$  = Variância da geração F<sub>1</sub>;

$\sigma_A^2$  = Variância de aditividade;

$\sigma_{F2}^2$  = Variância fenotípica da geração F<sub>2</sub>;

$\sigma^2_{RCs}$  = Variância do RC<sub>s</sub>;

$\sigma^2_{RCr}$  = Variância do RC<sub>r</sub>;

$\sigma^2_D$  = Variância de dominância;

$\sigma^2_G$  = Variância genética;

$\sigma^2_F$  = Variância fenotípica;

#### 2.4.6.3 Herdabilidade

A estimativa das herdabilidades no sentido amplo ( $h^2_a$ ) e no sentido restrito ( $h^2_r$ ) foi baseada nos componentes da variância, conforme proposto por Ramalho, Santos e Pinto (2008), utilizando o programa computacional Libre Office Calc (LIBRE OFFICE, 2013):

$$h^2_a = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_{F2}^2} \times 100$$

$$h^2_r = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_{F2}^2} \times 100$$

Em que:

$\sigma^2_G$  = Variância genética;

$\sigma^2_A$  = Variância de aditividade;

$\sigma^2_{F2}$  = Variância fenotípica da geração F<sub>2</sub>;

#### 2.4.6.4 Modelos de regressão

Os dados de controle [100 – controle (%)], matéria verde e matéria seca foram submetidos à análise de variância pelo teste F (P<0,05) utilizando o programa computacional Genes (CRUZ, 2013). As relações entre as variáveis dependentes e as doses de herbicida foram ajustadas através do modelo de regressão não linear, empregando-se o modelo logístico de três (Equação 1) e quatro (Equação 2) parâmetros com o auxílio do programa computacional SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2014).

Equação 1. Modelo logístico de três parâmetros.

$$y = \frac{a}{1 + abs\left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

Onde: y= variável dependente; a= assíntota superior da equação; b= declividade da curva; x= dose do herbicida; x<sub>0</sub>= dose do herbicida que proporciona 50% de controle (C<sub>50</sub>) ou a dose de herbicida que proporciona 50% de redução da matéria verde ou matéria seca (GR<sub>50</sub>).

Equação 2. Modelo logístico de quatro parâmetros.

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + abs\left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

Onde: y= variável dependente; y<sub>0</sub>= assíntota inferior da equação; a= assíntota superior da equação; b= declividade da curva; x= dose do herbicida; x<sub>0</sub>= dose do herbicida que proporciona 50% de controle (C<sub>50</sub>) ou a dose de herbicida que proporciona 50% de redução da matéria verde ou matéria seca (GR<sub>50</sub>).

Os fatores de resistência (FR's) foram calculados pelo quociente entre os C<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub> do resistente ou heterozigoto F<sub>1</sub> e o suscetível.

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1 Determinação do Número de Genes

O comportamento similar da população F<sub>1</sub> e RC<sub>r</sub>, indica que não existe gene segregando nos genitores S e R, para o caráter em estudo. Os valores para a variância e desvio padrão das populações da geração F<sub>2</sub> e RC<sub>s</sub> nos três cruzamentos foram elevados, tanto para aplicação normal quanto para aplicação no sentido inverso, pois se tratam de populações segregantes, constituídas por plantas suscetíveis e resistentes (Tabela 1).

**Tabela 1** – Nível de controle em porcentagem (\*), número de plantas (n), média ( $\bar{X}$ ), variância ( $\sigma^2$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) de cada população (P) de *E. heterophylla* para os três cruzamentos (C). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Aplicação Normal																																
PROTOX													ALS																			
C	P	10*	20	30	40	50	60	70	80	90	100	n	$\bar{X}$	$\sigma^2$	$\sigma$	C	P	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	n	$\bar{X}$	$\sigma^2$	$\sigma$	
1	R	5	21	26	1							53	24,34	48,11	6,93	R	39	13	1									53	12,83	24,52	4,95	
	S							5	15	2		22	78,64	31,38	5,60	S								5	15	2	22	78,64	31,38	5,60		
	F <sub>1</sub>	6	10	9									25	21,20	61,00	7,81	F <sub>1</sub>	17	8									25	13,20	22,67	4,76	
	F <sub>2</sub>	19	54	62	12						39	12	198	39,44	696,64	26,39	F <sub>2</sub>	39	57	12				3	4	55	28	198	46,81	1079,77	32,85	
	RCs		4	13							13		30	50,33	706,78	26,58	RCs	3	6							21		30	61	878,27	29,63	
RCr	4	10	19	2								35	25,42	60,84	7,80	RCr	22	13									35	13,71	24,03	4,90		
2	R	6	10	26								42	24,76	54,81	7,40	R	32	10									42	12,38	18,58	4,31		
	S							2	45	1		48	79,79	6,33	2,17	S									46	1	1	48	80,62	10,23	3,19	
	F <sub>1</sub>	12	8	7									27	18,14	69,51	8,32	F <sub>1</sub>	21	6									27	12,22	17,94	4,23	
	F <sub>2</sub>	23	68	45	1		1	2	28	16			184	37,28	754,32	27,46	F <sub>2</sub>	26	59	14				1	3	49	29	3	184	48,69	1089,00	33,00
	RCs				9	1			1	5	3	1	20	57,50	777,63	27,88	RCs		6	1					2	7	3	1	20	61	935,78	30,59
RCr	5	11	14									30	23	56,20	7,49	RCr	25	5									30	11,66	14,36	3,79		
3	R	5	21	26	1							53	24,34	48,11	6,93	R	39	13	1								53	12,83	24,52	4,95		
	S							1	37	2		40	80,25	7,62	2,76	S									1	37	2	40	80,25	7,62	2,76	
	F <sub>1</sub>	1	12	10									23	23,91	33,99	5,83	F <sub>1</sub>	17	6									23	12,60	20,25	4,48	
	F <sub>2</sub>	17	35	10	1			3	16				82	32,92	672,80	25,93	F <sub>2</sub>	17	31	3				2	5	22	2	82	40,12	907,39	30,12	
	RCs		2	3	1					9			15	59,33	706,67	26,58	RCs	1	2							9	2	1	15	70	800,00	28,28
RCr	10	16	3									29	17,58	40,39	6,35	RCr	23	6									29	12,06	16,99	4,12		
Aplicação Inversa																																
PROTOX													ALS																			
C	P	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	n	$\bar{X}$	$\sigma^2$	$\sigma$	C	P	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	n	$\bar{X}$	$\sigma^2$	$\sigma$	
1	F <sub>2</sub>	6	60	32	2			10	61	9		180	48,27	834,44	28,88	F <sub>2</sub>	44	70	21	3				8	28	6	180	32,94	713,62	26,71		
	RCs		4	4			6	8	3			25	54,40	467,33	21,61	RCs	1	10	3	1				7	3		25	38,80	444,33	21,07		
2	F <sub>2</sub>	10	20	12	1		5	4	18	1		71	42,39	781,32	27,95	F <sub>2</sub>	20	24	12	1				8	4	2	71	28,16	412,31	20,30		
	RCs	4					2	1	6	1		14	57,14	1021,97	31,96	RCs	3	4	1					2	1	3	14	40,71	837,91	28,94		
3	F <sub>2</sub>	39	58	15			4	47	47			210	44,23	837,93	28,94	F <sub>2</sub>	74	69	12					7	39	9	210	30,23	610,94	24,71		
	RCs	1	2				1		8	2	2	16	70,62	806,25	28,39	RCs	3	5						1	3	4	16	49,37	1232,91	35,11		

Após a exposição das plantas aos herbicidas fomesafen e imazethapyr, houve pequena diferença de controle entre as plantas do biótipo S, assim como entre as plantas do biótipo R e da geração  $F_1$ , resultando em pequena diferença de controle de cada uma das observações e a média geral de controle de cada população menos um ( $n-1$ ), proporcionando variância de ambiente relativamente baixa para a resistência a inibidores da PROTOX, cerca de 46,8, 43,6 e 29,9, assim como, para a resistência a inibidores da ALS, cerca de 26,2, 15,6 e 17,4, para os cruzamentos 1, 2 e 3 respectivamente (Tabela 2).

Constatou-se variância de dominância baixa para inibidores da PROTOX e negativa para inibidores da ALS, variância de aditividade elevada e alta herdabilidade no sentido restrito para ambas as resistências (Tabela 2). Isso evidencia a expressiva contribuição da aditividade na manifestação da resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS e PROTOX.

A variância de dominância negativa, observada para inibidores da ALS ocorreu em decorrência da distribuição dos dados, onde na população do  $RC_s$  houve um maior nível de controle das plantas S em comparação com a população  $F_2$  no cruzamento 3, resultando em uma alta variância. Além disso, nos cruzamentos 1 e 2 a variância da população do  $RC_s$  se manteve muito próxima a da  $F_2$ . Deste modo, a variância de dominância foi subestimada e a herdabilidade restrita superestimada.

A elevada herdabilidade no sentido amplo para a resistência a inibidores da PROTOX nos cruzamentos 1 (93,3%), 2 (94,2%), 3 (95,6%) e aos inibidores da ALS nos cruzamentos 1 (97,6%), 2 (98,6%) e 3 (98,1%), demonstra que o genótipo contribui expressivamente para a manifestação do fenótipo (Tabela 2). Portanto, a resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS e PROTOX é determinada por um fator genético, muito pouco influenciado pelos efeitos ambientais.

**Tabela 2** – Parâmetros genéticos para a resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da PROTOX e ALS. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Mecanismo de ação	Cruzamento	$\sigma^2_E$	$\sigma^2_A$	$\sigma^2_D$	$\sigma^2_G$	$\sigma^2_F$	$h^2_a$	$h^2_r$
PROTOX	1	46,8	625,7	24,1	649,8	696,6	93,3	89,8
	2	43,6	674,8	36,0	710,8	754,3	94,2	89,5
	3	29,9	598,6	44,3	642,9	672,8	95,6	89,0
ALS	1	26,2	1257,0	-203,6	1053,5	1079,7	97,6	116,4
	2	15,6	1227,8	-154,4	1073,4	1089,0	98,6	112,7
	3	17,4	997,8	-107,8	890,0	907,4	98,1	124,7

$\sigma^2_E$ = variância de ambiente;  $\sigma^2_A$ = variância de aditividade;  $\sigma^2_D$ = variância de dominância;  $\sigma^2_G$ = variância genética;  $\sigma^2_F$ = variância fenotípica;  $h^2_a$ = herdabilidade no sentido amplo;  $h^2_r$ = herdabilidade no sentido restrito.

A exposição das populações  $F_2$  e  $RC_s$  ao herbicida inibidor da PROTOX resultou na morte das plantas S e R ao inibidor da ALS na mesma aplicação. Na sequência, a exposição das mesmas plantas ao inibidor da ALS resultou na morte das plantas R ao inibidor da PROTOX, permitindo a identificação das plantas R ao inibidor da PROTOX e com resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX. Dessa forma, não foi possível identificar o número de plantas S e R ao inibidor da ALS. Contudo, considerando-se a hipótese de que dois genes estariam condicionando a resistência múltipla ao ALS/PROTOX a segregação esperada na população  $F_2$  seria 9:3:3:1 e na população  $RC_s$  seria 1:1:1:1. Assim, a proporção dos indivíduos S e R ao inibidor da ALS foi estimada, considerando uma proporção de 3:1 na população  $F_2$ , (3 plantas R ao inibidor da ALS em relação a cada planta S) e proporção 1:1 na população  $RC_s$ . Este método de estimação também foi utilizado na aplicação inversa, já que a exposição das populações  $F_2$  e  $RC_s$  ao herbicida inibidor da ALS proporcionou o controle das plantas S e R aos inibidores da PROTOX na mesma aplicação.

Os genitores S e R após a aplicação do herbicida fomesafen e sequencial com imazethapyr (Aplicação normal), comportaram-se de forma suscetível e resistente conforme o esperado. Da mesma forma que para o genitor homozigoto R, todas as plantas heterozigotas da geração  $F_1$  mostraram-se resistentes frente à aplicação de ambos os herbicidas (Tabela 3).

**Tabela 3** – Resposta das populações S, R, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>s</sub> e RC<sub>r</sub> nas diferentes classes, submetidas a aplicação do herbicida fomesafen e sequencial com imazethapyr. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Cruzamento	População	Nº Plantas	ALS/PROTOX	ALS	PROTOX	Suscetível	Proporção		$\chi^2$ Cal	P-valor
							Esperada	Observada		
1	Resistente	53	53	-	-	0	-	-	-	-
	Suscetível	22	0	-	-	22	-	-	-	-
	F <sub>1</sub>	25	25	-	-	0	1:0	1:0	0,000	1,00
	F <sub>2</sub>	198	108	38	39	13	9:3:3:1	8,73:3,07:3,15:1,05	0,249	0,97
	RC <sub>s</sub>	30	9	7	8	6	1:1:1:1	1,20:0,93:1,07:0,80	0,667	0,88
	RC <sub>r</sub>	35	35	-	-	0	1:0	1:0	0,000	1,00
2	Resistente	42	42	-	-	0	-	-	-	-
	Suscetível	48	0	-	-	48	-	-	-	-
	F <sub>1</sub>	27	27	-	-	0	1:0	1:0	0,000	1,00
	F <sub>2</sub>	184	99	35	38	12	9:3:3:1	8,61:3,04:3,30:1,04	0,580	0,90
	RC <sub>s</sub>	20	7	5	3	5	1:1:1:1	1,40:1,00:0,60:1,00	1,600	0,66
	RC <sub>r</sub>	30	30	-	-	0	1:0	1:0	0,000	1,00
3	Resistente	53	53	-	-	0	-	-	-	-
	Suscetível	40	0	-	-	40	-	-	-	-
	F <sub>1</sub>	23	23	-	-	0	1:0	1:0	0,000	1,00
	F <sub>2</sub>	82	51	14	12	5	9:3:3:1	9,95:2,73:2,34:0,98	1,382	0,71
	RC <sub>s</sub>	15	3	5	3	4	1:1:1:1	0,80:1,33:0,8:1,07	0,733	0,87
	RC <sub>r</sub>	29	29	-	-	0	1:0	1:0	0,000	1,00

P-valor = Probabilidade valor.  $\chi^2$  tabelado para quatro classes fenotípicas (9:3:3:1)= 7,82 e para duas classes (1:0) = 3,84.

Isso evidencia que a resistência presente no genitor masculino foi transmitida para os descendentes através do cruzamento, confirmando o tipo de herança nuclear, e pelo fato da geração  $F_1$  manifestar apenas o fenótipo resistente, confirma que o alelo dominante domina sobre o alelo recessivo, portanto, o genótipo do genitor homocigoto suscetível é “ap” e do genitor homocigoto resistente é “AP” (ALS e PROTOX). Dessa forma, os genes que estão envolvidos na manifestação da resistência aos inibidores da ALS e PROTOX em *E. heterophylla* apresentam herança nuclear e são dominantes.

Na geração  $F_2$ , a segregação observada para o número de genes envolvidos na resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX para os cruzamentos 1 (8,73:3,07:3,15:1,05), 2 (8,61:3,04:3,30:1,04) e 3 (9,95:2,73:2,34:0,98) com  $\chi^2_{\text{Cal}} < 7,82 \chi^2_{\text{Tab}}$ , não diferiu da proporção de 9:3:3:1, esperada para herança envolvendo dois genes nucleares e com dominância completa (Tabela 3).

Assim, pode-se inferir que na reprodução das plantas heterocigóticas da geração  $F_1$  são produzidos quatro gametas distintos na mesma proporção (1/4), em que os cromossomos homólogos de cada um dos dois genes segregam (separam) de forma independente durante a meiose na formação das células sexuais, de modo que metade dos gametas carrega um dos alelos de cada gene e a outra metade carrega o outro alelo (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008). Por esse motivo os dois genes que conferem a resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX em *E. heterophylla* estão situados em diferentes cromossomos.

O baixo valor de  $\chi^2$  calculado para os cruzamentos 1, 2 e 3 forneceu uma alta probabilidade de ajuste da proporção observada em relação à proporção esperada, sendo 0,97, 0,90 e 0,71, respectivamente.

A segregação observada no retrocruzamento suscetível ( $RC_s$ ) para os cruzamentos 1 (9:7:8:6), 2 (7:5:3:5) e 3 (3:5:3:4) proporcionou  $\chi^2_{\text{Cal}} < 7,82 \chi^2_{\text{Tab}}$ , portanto, pode-se inferir que o  $\chi^2_{\text{Cal}}$  não é significativo e que a proporção observada se ajusta a proporção 1:1:1:1, esperada para características governadas por dois genes. As probabilidades para os cruzamentos 1, 2 e 3 foram de 0,88, 0,66 e 0,87, respectivamente (Tabela 3).

Todas as plantas oriundas dos três retrocruzamento resistente (RC<sub>r</sub>), apresentaram resistência aos inibidores da ALS/PROTOX, indicando que há dois genes controlando a característica de resistência (Tabela 3).

Esses resultados observados nos dois retrocruzamentos confirmam a hipótese genética da existência de dois genes nucleares e dominantes conferindo a resistência múltipla em *E. heterophylla*.

Na geração F<sub>2</sub>, submetida à aplicação do herbicida imazethapyr com sequencial de fomesafen (aplicação inversa), a proporção observada para os cruzamentos 1 (8,89:3,38:2,84:0,89), 2 (9,70:3,15:2,25:0,90) e 3 (8,53:3,28:3,12:1,07) proporcionou  $\chi^2_{\text{Cal}} < 7,82 \chi^2_{\text{Tab}}$ , não diferindo da proporção 9:3:3:1, esperada quando dois genes nucleares e dominantes estão envolvidos na determinação da característica (Tabela 4). As probabilidades para os cruzamentos 1, 2 e 3 foram 0,85, 0,77 e 0,86, respectivamente.

Não houve diferença entre a proporção observada no RC<sub>s</sub> para os cruzamentos 1 (1,28:1,12:0,80:0,80), 2 (1,14:1,14:0,86:0,86) e 3 (0,75:1,25:1:1) da proporção esperada 1:1:1:1, pelo teste de qui-quadrado, com probabilidade de 0,78, 0,96 e 0,92, respectivamente, para os cruzamentos 1, 2 e 3 (Tabela 4).

Esses resultados observados na aplicação inversa dos herbicidas corroboram com os resultados obtidos na aplicação normal, indicando que independentemente da ordem de aplicação dos herbicidas, a conclusão obtida através do teste de qui-quadrado não é alterada. Portanto, esses resultados permitem inferir que o método utilizado para estimar o número de plantas R aos inibidores da ALS e S na aplicação normal e o número de plantas R aos inibidores da PROTOX e S na aplicação inversa é adequado.

**Tabela 4** – Resposta das populações F<sub>2</sub> e RC<sub>s</sub> nas diferentes classes, submetidas à aplicação do herbicida imazethapyr e sequencial com fomesafen. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Cruzamento	População	Nº Plantas	ALS/PROTOX	ALS	PROTOX	Suscetível	Proporção		$\chi^2$ Cal	P-valor
							Esperada	Observada		
1	F <sub>2</sub>	180	100	38	32	10	9:3:3:1	8,89:3,38:2,84:0,89	0,780	0,85
	RCs	25	8	7	5	5	1:1:1:1	1,28:1,12:0,80:0,80	1,080	0,78
2	F <sub>2</sub>	71	43	14	10	4	9:3:3:1	9,70:3,15:2,25:0,90	1,138	0,77
	RCs	14	4	4	3	3	1:1:1:1	1,14:1,14:0,86:0,86	0,286	0,96
3	F <sub>2</sub>	210	112	43	41	14	9:3:3:1	8,53:3,28:3,12:1,07	0,777	0,86
	RCs	16	3	5	4	4	1:1:1:1	0,75:1,25:1,00:1,00	0,500	0,92

P-valor= Probabilidade valor.  $\chi^2$  tabelado para quatro classes fenotípicas (9:3:3:1) = 7,82.

Além do estudo realizado para a resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX foi investigada a herança genética, os efeitos gênicos e o número de genes envolvidos na resistência simples de *E. heterophylla* aos inibidores da enzima PROTOX e da enzima ALS.

Para a resistência simples aos inibidores da PROTOX, a proporção observada de plantas R ao inibidor da PROTOX e S na geração F<sub>2</sub> submetida à aplicação do herbicida fomesafen para os cruzamentos 1 (2,97:1,03), 2 (2,98:1,02) e 3 (3,07:0,93) não diferiu pelo teste de qui-quadrado da proporção 3:1, esperada quando um único gene nuclear e dominante determina a característica (Tabela 5).

O baixo valor de qui-quadrado calculado forneceu uma alta probabilidade de ajuste da proporção observada em relação à proporção esperada, sendo 0,81, 0,86 e 0,70 para os cruzamentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Esses resultados confirmam que a resistência de *E. heterophylla* aos herbicidas inibidores da enzima PROTOX é condicionada pela ação de um único gene de herança nuclear e com dominância completa.

Resultados similares aos obtidos com *E. heterophylla* foram observados para as espécies de *Amaranthus tuberculatus* (PATZOLDT et al., 2006) e *Ambrosia artemisiifolia* (ROUSONELOS et al., 2012) resistentes aos herbicidas inibidores da PROTOX, em que a resistência é condicionada por um único gene dominante e nuclear, no entanto, com dominância incompleta.

**Tabela 5** – Resposta da população segregante F<sub>2</sub> nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida fomesafen. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Cruzamento	Nº Plantas	Resistente PROTOX	Suscetível	Proporção		$\chi^2_{\text{Cal}}$	P-valor
				Esperada	Observada		
1	198	147	51	3:1	2,97:1,03	0,061	0,81
2	184	137	47	3:1	2,98:1,02	0,029	0,86
3	82	63	19	3:1	3,07:0,93	0,146	0,70

P-valor= Probabilidade valor.  $\chi^2$  tabelado para duas classes fenotípicas (3:1) = 3,84.

Os resultados observados no RC<sub>s</sub> para os cruzamentos 1 (1,13:0,87), 2 (1:1) e 3 (0,8:1,2) submetidos a aplicação do herbicida fomesafen não diferiram pelo teste de qui-quadrado da proporção esperada 1:1, com probabilidade de 0,47, 1 e 0,44, respectivamente (Tabela 6).

Todas as plantas da geração do RC<sub>r</sub> submetidas à aplicação do herbicida fomesafen foram resistentes (Tabela 3). Dessa forma, esses resultados confirmam a hipótese genética de segregação de 3:1 na geração F<sub>2</sub>, evidenciando que um único gene determina a manifestação da resistência.

**Tabela 6** – Resposta da população segregante do retrocruzamento suscetível (RC<sub>s</sub>) nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida fomesafen inibidor da enzima PROTOX. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Cruzamento	Nº Plantas	Resistente PROTOX	Suscetível	Proporção		$\chi^2_{\text{Cal}}$	P-valor
				Esperada	Observada		
1	30	17	13	1:1	1,13:0,87	0,533	0,47
2	20	10	10	1:1	1:1	0,000	1,00
3	15	6	9	1:1	0,8:1,2	0,600	0,44

P-valor= Probabilidade valor.  $\chi^2$  tabelado para duas classes fenotípicas (1:1) = 3,84.

Para a resistência simples aos herbicidas inibidores da ALS, na geração F<sub>2</sub> submetida a aplicação do herbicida imazethapyr, a proporção observada de plantas R ao inibidor da ALS e S para os cruzamentos 1 (3,07:0,93), 2 (3,21:0,79) e 3 (2,95:1,05) resultou em  $\chi^2_{\text{Cal}} < 3,84 \chi^2_{\text{Tab}}$ , portanto, o  $\chi^2_{\text{Cal}}$  não é significativo e a proporção observada se ajusta a proporção 3:1, esperada para característica controlada por um único gene nuclear e dominante (Tabela 7).

Os valores de qui-quadrado calculado forneceram uma probabilidade de ajuste da proporção observada em relação à esperada, de 0,61, 0,30 e 0,69, para os cruzamentos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 7).

Mais uma vez, a ação de um único gene de herança nuclear e com dominância completa conferindo a resistência de *E. heterophylla* aos herbicidas inibidores da enzima ALS é confirmada.

**Tabela 7** – Resposta da população segregante F<sub>2</sub> nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida imazethapyr. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Cruzamento	Nº Plantas	Resistente ALS	Suscetível	Proporção		$\chi^2_{\text{Cal}}$	P-valor
				Esperada	Observada		
1	180	138	42	3:1	3,07:0,93	0,267	0,61
2	71	57	14	3:1	3,21:0,79	1,056	0,30
3	210	155	55	3:1	2,95:1,05	0,159	0,69

P-valor= Probabilidade valor.  $\chi^2$  tabelado para duas classes fenotípicas (3:1) = 3,84.

A aplicação do herbicida imazethapyr sobre as plantas do RC<sub>s</sub> resultou na proporção de plantas R ao inibidor da ALS e S para os cruzamentos 1 (1,2:0,8), 2 (1,14:0,86) e 3 (1:1), que não diferiu pelo teste de qui-quadrado da proporção 1:1, esperada quando apenas um gene condiciona a característica, com probabilidade de 0,32, 0,59 e 1 para os cruzamentos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 8).

Todas as plantas da geração do RC<sub>r</sub> submetidas a aplicação do herbicida imazethapyr foram resistentes (Tabela 3). Esses resultados confirmam a hipótese genética de segregação 3:1 observada na geração F<sub>2</sub>, evidenciando a ação de um único gene na manifestação da resistência.

Resultados similares foram observados em biótipo de *E. heterophylla* com resistência apenas a inibidores da ALS (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001), em que essa característica de resistência é conferida pela ação de um único gene dominante e nuclear, com dominância completa. Segundo Tranel, Wright (2002) a maioria dos casos de resistência aos inibidores da enzima ALS são conferidos pela ação de um gene dominante e nuclear.

**Tabela 8** – Resposta da população segregante do retrocruzamento suscetível (RC<sub>s</sub>) nas diferentes classes, submetida à aplicação do herbicida imazethapyr. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

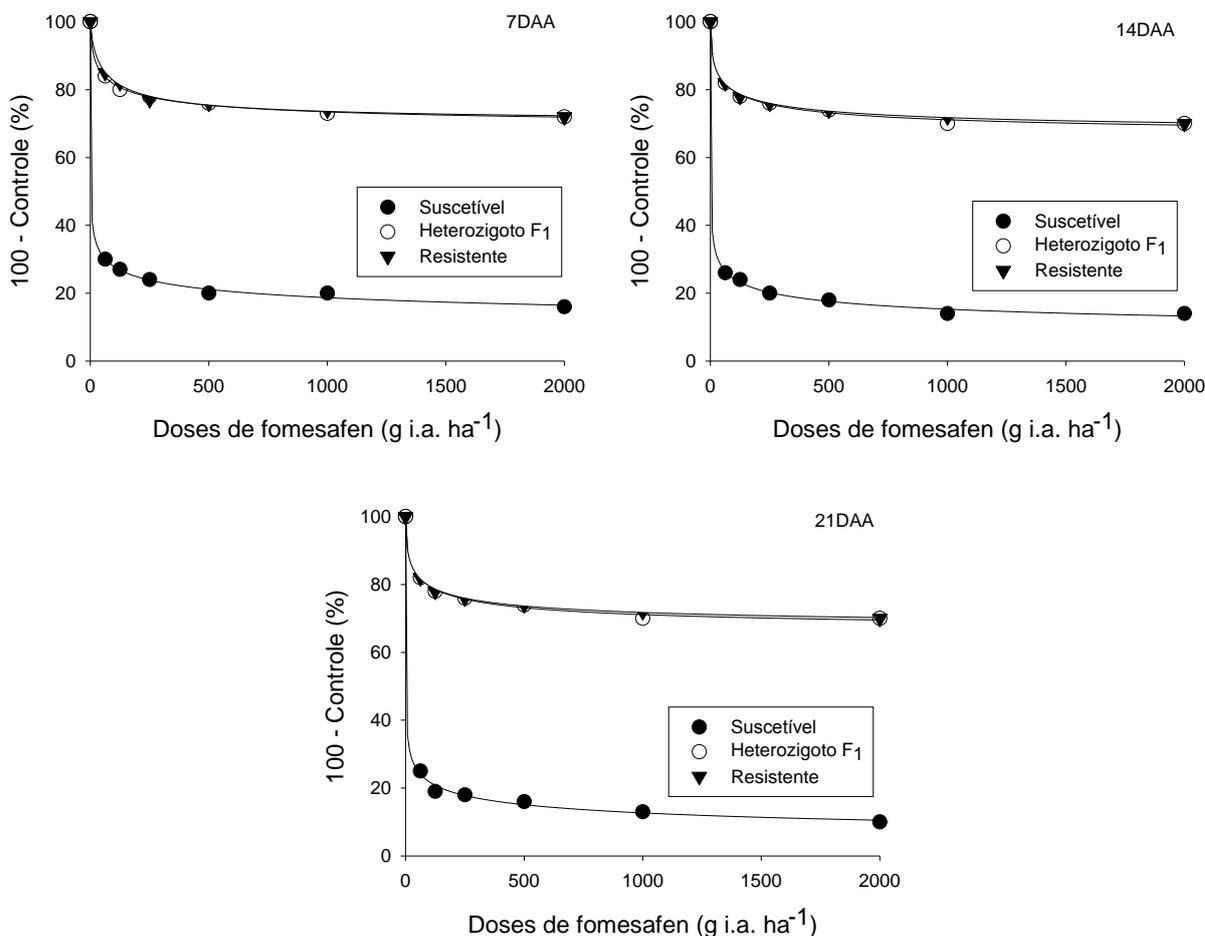
Cruzamento	Nº Plantas	Resistente ALS	Suscetível	Proporção		$\chi^2_{\text{Cal}}$	P-valor
				Esperada	Observada		
1	25	15	10	1:1	1,2:0,8	1,000	0,32
2	14	8	6	1:1	1,14:0,86	0,286	0,59
3	16	8	8	1:1	1:1	0,000	1,00

*P-valor*= Probabilidade valor.  $\chi^2$  tabelado para duas classes fenotípicas (1:1) = 3,84.

### 2.5.2 Curvas de Resposta à Dose

Na curva de resposta à dose ao inibidor da PROTOX, a aplicação de 62,5 g i.a. ha<sup>-1</sup> de fomesafen resultou em níveis de controle para o biótipo S de 70%, 74% e 76%, respectivamente, aos 7, 14 e 21 DAA, enquanto que, o nível máximo de controle nessa dose para o heterozigoto F<sub>1</sub> e o biótipo R foi de 18% aos 21 DAA (Figura 1).

A maior dose do herbicida fomesafen, de 2000 g i.a. ha<sup>-1</sup>, proporcionou elevados níveis de controle para o biótipo S de 84%, 86% e 90%, aos 7, 14 e 21 DAA, respectivamente. Para o heterozigoto F<sub>1</sub> e o biótipo R o nível máximo de controle na maior dose foi de 30% aos 14 DAA, não havendo aumento no nível de controle para a avaliação aos 21 DAA (Figura 1).



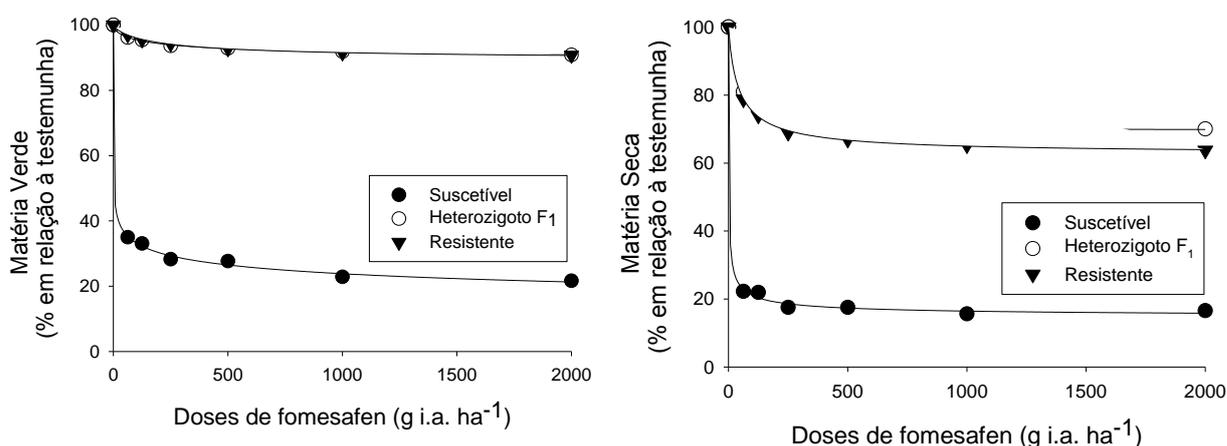
**Figura 1** – Controle [100 - Controle (%)] dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto F<sub>1</sub> e homocigoto resistente, em função das doses de fomesafen aos 7, 14 e 21 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

A aplicação de 62,5 g i.a. ha<sup>-1</sup> do herbicida fomesafen reduziu 65%, 3,82% e 3% a MV e 77,76%, 19% e 21,20% a MS do biótipo S, do heterocigoto F<sub>1</sub> e do biótipo R, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 2).

A elevação das doses do herbicida resultou na redução na MV e MS para os biótipos S, R e o heterocigoto F<sub>1</sub>. A dose de 2000 g i.a. ha<sup>-1</sup> do herbicida fomesafen reduziu 78,37%, 9,16% e 9,25% a MV e 83,44%, 29,95% e 36,25% a MS do biótipo S, do heterocigoto F<sub>1</sub>, e do biótipo R, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 2).

As determinações de controle [100 - Controle (%)], MV e MS revelam que, tanto as plantas homocigotas para a resistência, com os dois alelos dominantes, quanto às plantas heterocigotas com apenas um alelo dominante, manifestaram níveis similares de resistência para doses até 2000 g i.a. ha<sup>-1</sup> de

fomesafen, enquanto que as plantas do biótipo suscetível foram controladas com dose de 62,5 g i.a. ha<sup>-1</sup>, confirmando a dominância completa da resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da PROTOX.



**Figura 2** – Matéria verde e matéria seca (% em relação à testemunha) dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto (F<sub>1</sub>) e homocigoto resistente, em função das doses de fomesafen aos 21 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Os valores de C<sub>50</sub> do biótipo suscetível diminuíram com o decorrer dos períodos de avaliação devido ao aumento nos níveis de controle proporcionados pelo herbicida. Os C<sub>50</sub> do heterocigoto F<sub>1</sub> e do biótipo resistente aos 14 e 21 DAA permaneceram iguais por não haver elevação do nível de controle de uma avaliação para a outra (Tabela 9).

Houve similaridade dos fatores de resistência (FR's) para os níveis de controle [100 – Controle (%)] do heterocigoto F<sub>1</sub> e do biótipo resistente que foram, respectivamente, de 40,78 e 43,85 aos 7 DAA, 47,80 e 41,68 aos 14 DAA e 52,63 e 45,90 aos 21 DAA (Tabela 9).

**Tabela 9** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro ( $QME$ ), fator de resistência ( $FR$ ) e probabilidade ( $P$ ) para o nível de controle das populações suscetível, heterozigoto  $F_1$  e resistente aos 7, 14 e 21 DAA do herbicida fomesafen. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

DAA	Genótipo	Parâmetros <sup>2</sup>				$R^2$	$QME$	$FR$	$P$
		$a$	$b$	$C_{50}$	$y_0$				
7	Suscetível	-98,154	-0,240	1,429	100,000	0,99	1,1051	-	<0,0001
	Heterozigoto $F_1$	32,007	0,557	58,272	67,998	0,99	0,3620	40,78	0,0001
	Resistente	29,803	0,739	62,660	70,199	0,99	0,7028	43,85	0,0004
14	Suscetível	97,857	0,273	1,079	2,142	0,99	1,0965	-	<0,0001
	Heterozigoto $F_1$	34,621	0,543	51,575	65,379	0,99	0,8929	47,80	0,0005
	Resistente	-33,896	-0,518	44,979	100,007	0,99	0,2779	41,68	<0,0001
21	Suscetível	102,856	0,249	0,980	-2,855	0,99	1,7705	-	<0,0001
	Heterozigoto $F_1$	34,621	0,543	51,575	65,379	0,99	0,8929	52,63	0,0005
	Resistente	-33,896	-0,518	44,979	100,007	0,99	0,2779	45,90	<0,0001

<sup>1</sup> Equação logística de quatro parâmetros. <sup>2</sup> $a$ = assíntota superior da equação;  $b$ = declividade da curva;  $C_{50}$ = dose de herbicida que produz 50% de controle;  $y_0$ = assíntota inferior da equação.  $FR$ =  $C_{50}$  resistente ou heterozigoto  $F_1/C_{50}$  suscetível.

Na determinação de MV e MS para o heterozigoto  $F_1$  e biótipo resistente, os  $FR$ 's foram, respectivamente, de 43,88 e 43,49 para MV e 41,34 e 44,60 para MS (Tabela 10). Da mesma forma que observado para os níveis de controle [100 – controle (%)], houve similaridade para os  $FR$ 's na determinação de MV e MS, e esta similaridade confirma o caráter dominante da resistência.

O elevado nível de resistência e também a existência de resistência cruzada, constatados em outros trabalhos (TREZZI et al., 2005; TREZZI et al., 2011a) indicam a ineficiência agrônômica da adoção de doses mais elevadas e da rotação com herbicidas do mesmo mecanismo de ação. Além de não proporcionar elevação do nível de controle, a elevação das doses desses herbicidas também pode acarretar impacto ambiental elevado.

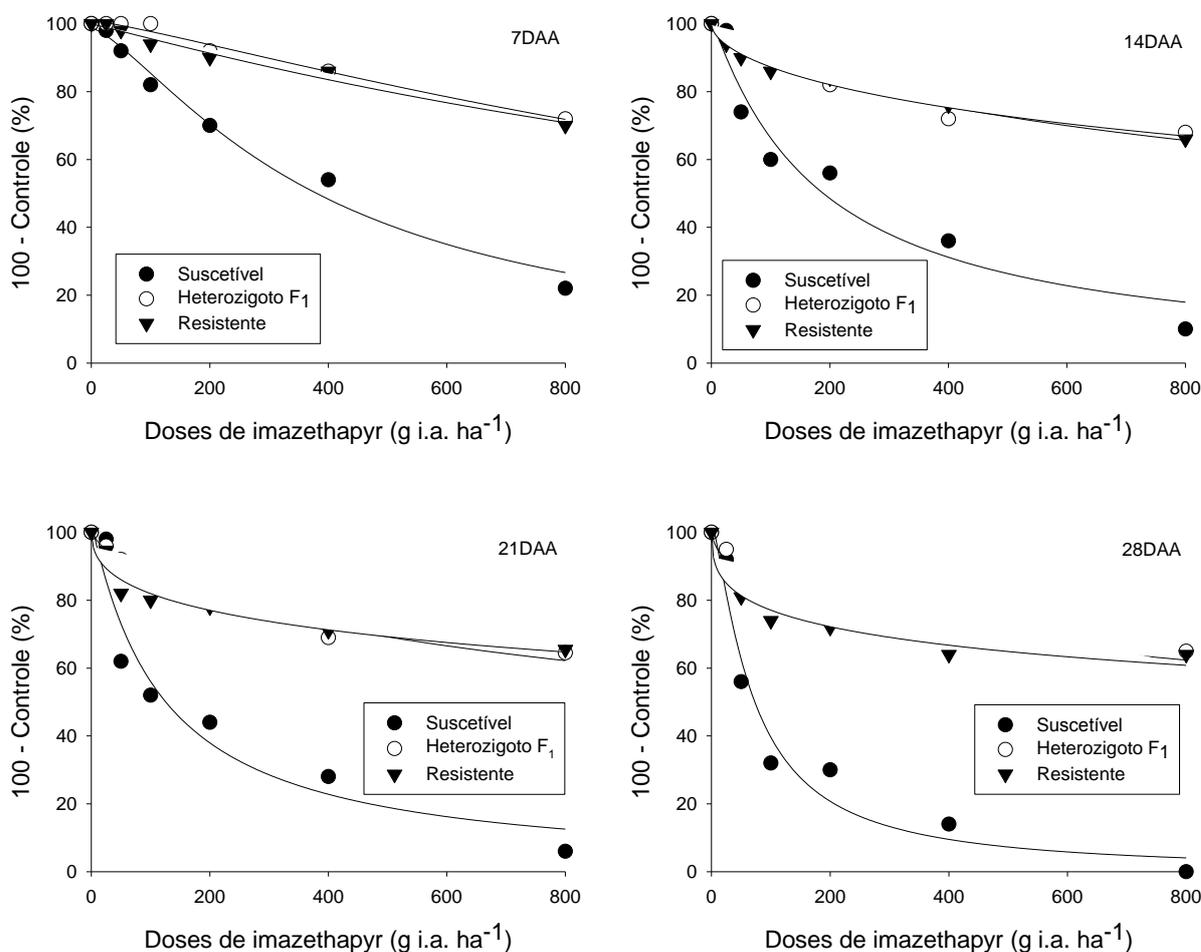
**Tabela 10** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro ( $QME$ ), fator de resistência ( $FR$ ) e probabilidade ( $P$ ) para matéria verde (MV) e matéria seca (MS) das populações suscetível, heterozigoto  $F_1$  e resistente aos 21 DAA do herbicida fomesafen. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Avaliação	Genótipo	Parâmetros <sup>2</sup>				$R^2$	$QME$	$FR$	$P$
		$a$	$b$	$GR_{50}$	$y_0$				
Matéria Verde	Suscetível	105,411	0,178	4,619	-5,411	0,99	1,4686	-	<0,0001
	Heterozigoto $F_1$	11,366	0,607	202,588	88,634	0,99	0,0673	43,88	0,0004
	Resistente	10,774	0,797	200,879	89,228	0,99	0,0114	43,49	<0,0001
Matéria Seca	Suscetível	85,558	0,543	1,041	14,441	0,99	1,7337	-	<0,0001
	Heterozigoto $F_1$	30,291	1,331	43,036	69,702	0,99	0,3902	41,34	0,0001
	Resistente	37,339	0,882	46,438	62,659	0,99	0,2292	44,60	<0,0001

<sup>1</sup> Equação logística de quatro parâmetros. <sup>2</sup> $a$ = assíntota superior da equação;  $b$ = declividade da curva;  $GR_{50}$ = dose de herbicida que proporciona 50% de redução da MV ou MS;  $y_0$ = assíntota inferior da equação.  $FR$ =  $GR_{50}$  resistente ou heterozigoto  $F_1/GR_{50}$  suscetível.

Na curva de resposta à dose ao ALS, a elevação das doses do herbicida imazethapyr proporcionou aumento no nível de controle dos biótipos S, R e do heterozigoto F<sub>1</sub>. A dose comercial 100 g i.a. ha<sup>-1</sup> de imazethapyr foi suficiente para proporcionar 68% de controle do biótipo S aos 28 DAA, enquanto que o nível máximo de controle observado para o heterozigoto F<sub>1</sub> e o biótipo R foi de apenas 16% e 26% aos 28 DAA (Figura 3).

A maior dose de imazethapyr 800 g i.a. ha<sup>-1</sup> proporcionou níveis elevados de controle para o biótipo S de 78%, 90%, 94% e 100%, respectivamente aos 7, 14, 21 e 28 DAA. No entanto, para o heterozigoto F<sub>1</sub>, a maior dose proporcionou níveis máximos de controle de 28%, 32%, 36% e 36%, e para o biótipo R de 30%, 34%, 34% e 36%, respectivamente aos 7, 14, 21 e 28 DAA (Figura 3). Níveis elevados de resistência para o biótipo resistente de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS/PROTOX também foram constatados por Xavier (2014).



**Figura 3** – Controle [100 - Controle (%)] dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto F<sub>1</sub> e homocigoto resistente, em função das doses de imazethapyr aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Houve diminuição dos valores de  $C_{50}$  do biótipo S com o decorrer do período de avaliação, em função dos níveis de controle crescentes proporcionados pelo herbicida. Os valores de  $C_{50}$  observados para o heterocigoto F<sub>1</sub> e o biótipo R foram elevados, acima da dose máxima testada de 800 g i.a. ha<sup>-1</sup>, resultando respectivamente nos FR's de 4,35 e 4,78, aos 7 DAA, 10,85 e 14,42, aos 14 DAA, 13,86 e 26,69 aos 21 DAA, e 28,86 e 36,65, aos 28 DAA (Tabela 11).

Os FR's aumentaram com o decorrer das avaliações por que os valores de  $C_{50}$  do biótipo S diminuíram com o decorrer do período de avaliação e os valores de  $C_{50}$  do heterocigoto F<sub>1</sub> e do biótipo R permaneceram elevados (Tabela 11).

**Tabela 11** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro ( $QME$ ), fator de resistência ( $FR$ ) e probabilidade ( $P$ ) para o nível de controle das populações suscetível, heterozigoto  $F_1$  e resistente aos 7, 14, 21 e 28 DAA do herbicida imazethapyr. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

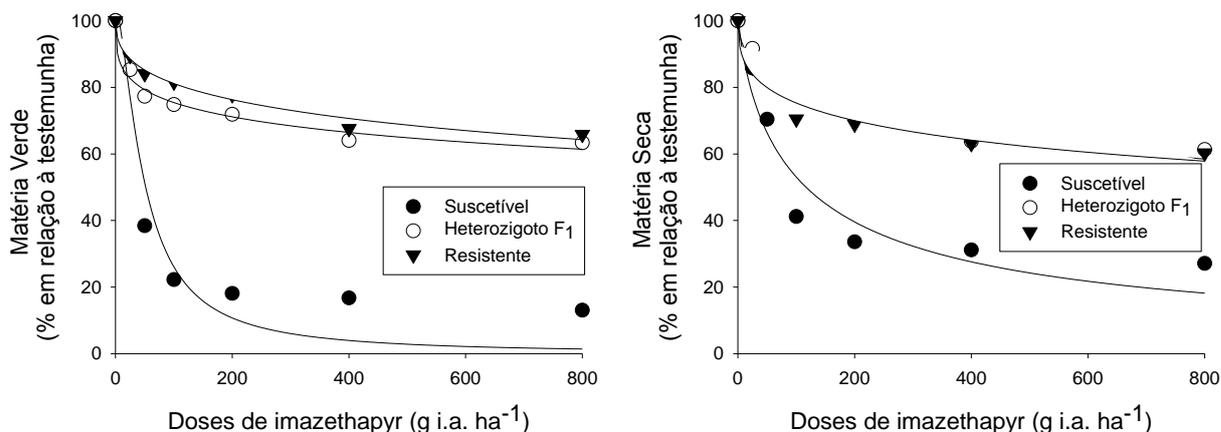
DAA	Genótipo	Parâmetros <sup>2</sup>			$R^2$	$QME$	$FR$	$P$
		$a$	$b$	$C_{50}$				
7	Suscetível	98,718	1,373	387,829	0,98	17,8081	-	0,0002
	Heterozigoto $F_1$	100,898	1,213	1687,518	0,98	2,4288	4,35	0,0002
	Resistente	99,934	1,061	1855,055	0,97	3,1325	4,78	0,0003
14	Suscetível	101,208	1,048	184,738	0,93	72,7118	-	0,0021
	Heterozigoto $F_1$	100,878	0,678	2004,184	0,95	7,3119	10,85	0,0010
	Resistente	99,613	0,596	2663,079	0,98	2,0213	14,42	0,0001
21	Suscetível	102,685	1,037	119,536	0,91	100,7118	-	0,0031
	Heterozigoto $F_1$	100,978	0,650	1657,358	0,97	5,0149	13,86	0,0003
	Resistente	100,606	0,428	3189,887	0,91	12,6525	26,69	0,0032
28	Suscetível	103,245	1,308	69,615	0,94	84,6209	-	0,0015
	Heterozigoto $F_1$	101,161	0,517	2009,293	0,95	8,7340	28,86	0,0011
	Resistente	100,598	0,367	2551,627	0,94	10,9122	36,65	0,0017

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. <sup>2</sup>  $a$ = assíntota superior da equação;  $b$ = declividade da curva;  $C_{50}$ = dose de herbicida que produz 50% de controle.  $FR$ =  $C_{50}$  resistente ou heterozigoto  $F_1/C_{50}$  suscetível.

Houve redução das matérias verde e seca em relação à testemunha para os biótipos homozigotos e o heterozigoto  $F_1$ . A dose de 800 g i.a.  $ha^{-1}$  do herbicida imazethapyr reduziu 86%, 36,66% e 34,13% a MV e 73%, 38,67% e 39,69% a MS do biótipo S, do heterozigoto  $F_1$  e do biótipo R, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 4).

Os níveis de controle observados durante os períodos de avaliação e as reduções nas matérias verde e seca mostram que o heterozigoto  $F_1$  apresentou comportamento similar ao biótipo homozigoto R para doses de até 800 g i.a.  $ha^{-1}$  de imazethapyr, enquanto o biótipo S foi controlado com a dose de 100 g i.a.  $ha^{-1}$ , confirmando a dominância completa da resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS.

Ação gênica com dominância completa também foi constatada para *E. heterophylla* resistente apenas a inibidores da ALS, em que plantas heterozigotas  $F_1$  e resistentes apresentaram o mesmo grau de resistência para doses de até 1600 g i.a.  $ha^{-1}$  de imazethapyr (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001).



**Figura 4** – Matéria verde e matéria seca (% em relação à testemunha) dos biótipos de *E. heterophylla* homocigoto suscetível, heterocigoto F<sub>1</sub> e homocigoto resistente, em função das doses de imazethapyr aos 28 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Os valores de GR<sub>50</sub> do heterocigoto F<sub>1</sub> e do biótipo R para MV foram de 2450,038 e 3249,209 g i.a. ha<sup>-1</sup> e para MS de 1601,505 e 1782,302, respectivamente. Os valores de GR<sub>50</sub> observados para o heterocigoto F<sub>1</sub> e biótipo R foram muito acima da dose comercial e da dose máxima testada no experimento, resultando em elevado FR para MV de 70,36 e 66,27 e para MS de 14,69 e 16,34, respectivamente (Tabela 12).

Houve similaridade entre os FR's do heterocigoto F<sub>1</sub> e do biótipo R para MV e MS, também observada para os períodos de avaliação, e essa similaridade confirma a dominância completa da resistência.

O elevado nível de resistência e a existência de resistência cruzada aos inibidores da ALS em *E. heterophylla* constatados em outros trabalhos (TREZZI et al., 2005; XAVIER, 2014) indicam que o aumento da dose do herbicida e a rotação de herbicidas pertencentes ao mesmo mecanismo de ação não proporciona elevação dos níveis de controle, não sendo agronomicamente justificável.

**Tabela 12** – Parâmetros da equação logística<sup>1</sup>, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quadrado médio do erro ( $QME$ ), fator de resistência ( $FR$ ) e probabilidade ( $P$ ) para matéria verde (MV) e matéria seca (MS) das populações suscetível, heterozigoto  $F_1$  e resistente aos 28 DAA do herbicida imazethapyr. UTFPR Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Avaliação	Genótipo	Parâmetros <sup>2</sup>			$R^2$	$QME$	$FR$	$P$
		$a$	$b$	$GR_{50}$				
Matéria Verde	Suscetível	104,204	1,540	49,031	0,86	184,9776	-	0,0082
	Heterozigoto $F_1$	100,217	0,315	3450,083	0,97	5,2928	70,36	0,0005
	Resistente	100,161	0,417	3249,209	0,97	4,0688	66,27	0,0004
Matéria Seca	Suscetível	102,742	0,771	109,044	0,90	89,4827	-	0,0047
	Heterozigoto $F_1$	100,815	0,466	1601,505	0,96	8,0986	14,69	0,0007
	Resistente	100,531	0,380	1782,302	0,94	11,3741	16,34	0,0014

<sup>1</sup> Equação logística de três parâmetros. <sup>2</sup>  $a$ = assíntota superior da equação;  $b$ = declividade da curva;  $GR_{50}$ = dose de herbicida que proporciona 50% de redução da MV ou MS.  $FR$ =  $GR_{50}$  resistente ou heterozigoto  $F_1/GR_{50}$  suscetível.

A partir das informações obtidas neste trabalho, pode-se inferir que os efeitos gênicos são de caráter aditivo, em que um gene é responsável por conferir a resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS e outro gene é responsável por conferir a resistência aos herbicidas inibidores da enzima PROTOX e quando ambos os genes estão presentes no mesmo indivíduo condicionam a resistência múltipla ao ALS e PROTOX.

O fato da herança da resistência de *E. heterophylla* a ambos os mecanismos de ação ALS e PROTOX ser do tipo nuclear é de fundamental importância, pois características genéticas com esse tipo de herança, em espécies que possuem fecundação cruzada, são rapidamente disseminadas na população através do fluxo de pólen (MARIANI et al., 2015; POWLES; YU, 2010; VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001). A migração de alelos via pólen, que é característica da resistência nuclear, determina evolução da resistência mais rápida, comparativamente a herança materna (EMBRAPA, 2006). A dispersão da resistência via pólen é influenciada pela eficiência de dispersão e a longevidade do pólen (MULUGETA, 1994).

Não existem estudos comprovando as taxas de autofecundação e fecundação cruzada de *E. heterophylla*, mas especula-se que pode ocorrer de ambas as formas (BARROSO, 2002). A reprodução por alogamia potencializa a disseminação da resistência múltipla aos inibidores das enzimas ALS e PROTOX, uma vez que os descendentes de plantas suscetíveis polinizadas por plantas homozigotas resistentes sempre irão herdar essa característica e manifestar a resistência. Além disso, o mecanismo de dispersão das sementes do tipo bolocoria

(deiscência explosiva) característico de *E. heterophylla*, favorece o fluxo gênico via sementes.

Outra implicação da fecundação cruzada refere-se ao surgimento de novas combinações genéticas e o acúmulo de genes de resistência (POWLES; YU, 2010). Assim, em lavouras com presença de plantas de *E. heterophylla* suscetíveis e com resistência múltipla, evidencia-se que essa população está segregando para os genes de resistência após haver fecundação cruzada seguido de autofecundação na geração seguinte.

Assim, estando a resistência de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS e da PROTOX em plantas diferentes devido a fecundação cruzada, elevam-se as probabilidades desses indivíduos resistentes evoluírem e manifestarem resistência a outros mecanismos de ação que venham a ser utilizados de forma inadequada nessa área, resultando em novos casos de resistência múltipla.

A existência de um único gene controlando a resistência simples aos inibidores da ALS em *E. heterophylla* (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001) e a constatação da existência também de um único gene que confere a resistência aos inibidores da ALS no biótipo com resistência múltipla ALS/PROTOX, sugere que o surgimento da resistência aos inibidores da PROTOX ocorreu após, de forma independente da resistência ao ALS.

Essa afirmação também ganha apoio no fato do primeiro caso de resistência múltipla a inibidores da PROTOX e ALS ter surgido 11 anos após o surgimento da resistência simples a inibidores da ALS (HEAP, 2016) e devido ao Sudoeste do Paraná, local de identificação do biótipo resistente aos inibidores da PROTOX, fazer parte de uma das regiões de distribuição geográfica da resistência aos inibidores da ALS (FELIPPI et al., 2004; TREZZI et al., 2005; VIDAL et al., 2004; WINKLER; VIDAL, 2004). Isso constitui um forte indicativo de que o biótipo de *E. heterophylla* com resistência múltipla ALS/PROTOX tenha sido selecionado e evoluído em resposta a tentativas de controle com diferentes mecanismos de ação herbicida. Ou seja, a resistência ao PROTOX surgiu provavelmente no modo cascata, como sugeriram Trezzi et al. (2005), em que os inibidores da ALS foram frequentemente utilizados para efetuar o controle de *E. heterophylla* até o surgimento da resistência, quando, visando solucionar esse problema, os inibidores

da PROTOX passaram a ser utilizados frequentemente, proporcionando a alta pressão de seleção das plantas, favorecendo o surgimento ou seleção do biótipo resistente a inibidores da PROTOX, determinando o caso de resistência múltipla.

Estudos envolvendo o uso de marcadores moleculares na identificação de marcas genéticas associadas aos genes de resistência aos inibidores das enzimas ALS e PROTOX em *E. heterophylla*, são de fundamental importância para desvendar o tipo de mutação e a localização aproximada dos genes de resistência. Também, possibilitariam a rápida identificação de biótipos resistentes, de modo a evitar ou reduzir os impactos negativos proporcionados pela resistência.

Além disso, estudos moleculares são importantes para desvendar se houve evolução de um biótipo, do qual a resistência foi disseminada para demais regiões onde casos de R foram identificados, ou se vários biótipos evoluíram ao mesmo tempo em diferentes locais, e também, se as alterações genéticas que conferem a resistência são iguais ou diferentes.

## 2.6 CONCLUSÕES

- I. A resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX em *E. heterophylla* é conferida pela ação de dois genes com dois alelos cada.
- II. Um único gene condiciona a resistência simples aos inibidores da enzima ALS e da enzima PROTOX.
- III. A resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da PROTOX ocorre de forma independente da resistência aos inibidores da ALS.
- IV. A ação gênica envolvida nas resistências é de dominância completa.
- V. Os efeitos gênicos são de caráter aditivo.

### 3 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA ALS E DA PROTOX EM *Euphorbia heterophylla* E DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

#### 3.1 RESUMO

A existência de poucos estudos moleculares para a maioria das espécies daninhas leva a escassez de informação genética. A obtenção de protocolos de extração de DNA específicos é conhecimento básico de fundamental importância para utilizar e desenvolver marcadores moleculares em *E. heterophylla* e contribuir para o progresso científico. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver marcadores moleculares associados à resistência aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX em *E. heterophylla*, verificar a possibilidade de utilizar marcadores SSR (Sequências Simples Repetidas) desenvolvidos para *Manihot esculenta* e determinar protocolos de extração de DNA específicos para a espécie. Iniciadores foram desenhados a partir da sequência consenso, resultante do alinhamento de sequências de DNA dos genes *ALS* e *PROTOX* de *Ricinus communis* e *Manihot esculenta*. Iniciadores SSRs desenvolvidos para *M. esculenta* foram transferidos para *E. heterophylla*. Além disso, foram testados 10 protocolos de extração de DNA baseados em dois protocolos descritos na literatura. Constatou-se que apenas os iniciadores não degenerados >003211m e >PPX1, desenhados para os genes *ALS* e *PROTOX*, respectivamente, amplificaram, mas não apresentaram polimorfismo que pudesse ser detectado em gel de agarose entre os biótipos suscetível e resistente de *E. heterophylla*. Dos dez marcadores SSR de *M. esculenta* transferidos para *E. heterophylla*, seis apresentaram polimorfismo entre os biótipos S e R. O protocolo 0,2%BME extraiu 7083 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA, sendo superior e estatisticamente diferente dos demais protocolos. Problemas por contaminação do DNA extraído foram observados apenas nos protocolos FENOL e 3%BME+TB. A adição de polivinilpirrolidona (PVP40) no tampão de extração foi suficiente para solucionar o problema de contaminação do DNA por compostos fenólicos. O protocolo de extração 0,2%BME é o mais indicado para extração de DNA da espécie *E. heterophylla*, pois não ocasiona contaminação por polifenóis, garante alta quantidade e qualidade do DNA extraído e demanda pouco tempo para extração.

### 3.2 ABSTRACT

The availability of few molecular works for the majority of weeds leads to lack of genetic information. Obtaining specific DNA isolation methods are a basic knowledge of fundamental importance to molecular markers studies in *E. heterophylla* and contribute to scientific progress. This study aimed to identify polymorphisms in resistance to ALS- and PROTOX-inhibiting herbicides in *E. heterophylla*, verify the possibility of using SSR (Simple Sequence Repeats) developed for *Manihot esculenta* and determine specific DNA isolation methods for the species. Primers were designed from consensus sequence resulting from the alignment of *Ricinus communis* and *Manihot esculenta* ALS and PROTOX genes. SSR primers designed for *M. esculenta* were transferred to *E. heterophylla*. In addition, we tested 10 DNA extraction protocols based on two protocols described in the literature. It was found that only the non-degenerate primers >003211m and >PPX1, designed to ALS and PROTOX genes, respectively, amplified, but did not show polymorphism between resistant and susceptible biotypes of *E. heterophylla*. From the ten *M. esculenta* SSR markers transferred to *E. heterophylla*, six showed polymorphism among the biotypes S and R. The 0.2%BME protocol extracts 7,083 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of DNA, being higher and statistically different from other protocols. Problems contamination of the extracted DNA were observed only in FENOL protocols and 3%BME+TB. The addition of polyvinylpyrrolidone (PVP40) in extraction buffer was enough solve the problem of contamination by phenolic compounds. The method 0.2%BME is the most suitable for DNA isolation from *E. heterophylla* as it does not cause contamination polyphenols, ensures high quantity and quality of DNA and demands less time for extraction.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A biotecnologia vem sendo cada vez mais empregada no estudo das plantas daninhas, contribuindo para a elucidação de mutações responsáveis por conferir resistência a herbicidas (ROSO; VIDAL, 2010), o conhecimento da variabilidade genética dentro e entre espécies, permitindo melhor compreensão do

comportamento e da evolução dessas plantas, além de servir como ponto de partida para estudos relacionados ao manejo de plantas infestantes (VIEIRA, 2007).

O desenvolvimento de marcadores moleculares é necessário para o estudo de sequências genéticas que permitem identificar regiões genômicas de interesse. Muitas vezes, o desenvolvimento de iniciadores apresenta custo elevado e assim, a transferibilidade de marcadores moleculares de uma espécie para outra é capaz de reduzir custos e permite viabilizar estudos principalmente em espécies que possuem pouca informação genética a disposição dos pesquisadores, como é o caso de muitas plantas daninhas (GOULART et al., 2011).

Além da inexistência de informação genética e de marcadores moleculares para o genoma ou específicos para os genes que codificam as enzimas ALS e PROTOX de *E. heterophylla*, a falta de protocolos de extração de DNA específicos para esta espécie são fatores que dificultam estudos em nível molecular. A *E. heterophylla* apresenta característica de produzir látex em grande quantidade (CRONQUIST, 1981), o qual é constituído por compostos fenólicos que dificultam a obtenção de DNA em quantidade e qualidade desejáveis (ROSO; VIDAL, 2010), justificando a necessidade de otimizar protocolos de extração específicos para esta espécie.

O biótipo de *E. heterophylla* identificado por Trezzi et al. (2005) apresenta resistência múltipla aos herbicidas inibidores das enzimas ALS e PROTOX, que são importantes mecanismos de ação utilizados no controle de plantas daninhas de folhas largas nas culturas da soja e feijão.

Os estudos em nível molecular buscando investigar o mecanismo de resistência nesse biótipo até o momento permanecem superficiais. Há necessidade de desvendar a mutação que confere resistência simples aos inibidores da ALS e PROTOX e verificar se a resistência múltipla a esses mecanismos de ação é devida a mutação nas enzimas.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver marcadores moleculares associados à resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da ALS e PROTOX, verificar a possibilidade de utilizar marcadores SSR desenvolvidos para *M. esculenta* e determinar protocolos de extração de DNA específicos para a espécie.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de extração de DNA foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco. Para o desenvolvimento das atividades moleculares utilizou-se o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal e o Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia Agroindustrial do Paraná (CENBAPAR).

#### 3.4.1 Protocolos de Extração de DNA Específicos para *E. heterophylla*

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, em que os tratamentos foram constituídos por 10 protocolos de extração de DNA baseados nos protocolos de Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas (1999) e Murray e Thompson (1980) com modificações de Roso e Vidal (2010) (Tabela 13).

Foram coletadas folhas jovens do biótipo suscetível de *E. heterophylla* em tubos Falcon e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido para que houvesse a paralização das reações químicas, evitando a degradação do DNA e contaminação por polifenóis. O tecido vegetal foi macerado em almofariz e pistilo na presença de nitrogênio líquido. Cada amostra (tubo de 2 mL) foi composta por cerca de 0,2 gramas de material vegetal macerado, aproximadamente o volume equivalente a marca de 500 µL.

**Tabela 13** – Resumo dos protocolos de extração de DNA. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Nº protocolo	Nome protocolo	Principais Diferenças	Referência
1	0,2% BME	0,2% $\beta$ -Mercaptoetanol	
2	1% BME	1% $\beta$ -Mercaptoetanol	
3	2% BME	2% $\beta$ -Mercaptoetanol	Doyle e Doyle (1987), com modificações
4	3% BME	3% $\beta$ -Mercaptoetanol	de Lefort e Douglas (1999)
5	4% BME	4% $\beta$ -Mercaptoetanol	
6	5% BME	5% $\beta$ -Mercaptoetanol	
7	FENOL	Fenol	
		Re-precipitação DNA	
8	3% BME+TA	3% $\beta$ -Mercaptoetanol	
		Tampão extração A	
		Re-precipitação DNA	
9	3% BME+TB	3% $\beta$ -Mercaptoetanol	Murray e Thompson (1980), com modificações
		Tampão extração B	de Roso e Vidal (2010)
		Re-precipitação DNA	
10	3% BME+(TB+PVP40)	3% $\beta$ -Mercaptoetanol	
		Tampão Original + PVP40	
		Re-precipitação DNA	

Descrição detalhada dos protocolos de extração:

**Protocolo 1 – (0,2% BME):**

Rompimento das paredes celulares: procedeu-se a maceração das amostras em almofariz e pistilo e com nitrogênio líquido, sempre tomando o cuidado para que não houvesse descongelamento do material vegetal.

Remoção dos lipídeos da membrana celular e exposição do conteúdo celular: Em cada tubo de 2 mL foram adicionados 0,2 g (~ 500  $\mu$ L) de tecido foliar macerado e adicionado 600  $\mu$ L de tampão de extração A (misturar com auxílio de vórtex) (Tabela 14). O tampão de extração foi pré-aquecido em banho maria à 60 °C por 15 minutos e logo antes do uso foi adicionado  $\beta$ -Mercaptoetanol (BME) 0,2%. Em seguida foi adicionado em cada tubo uma pequena quantidade de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) utilizando uma ponteira de 1 mL com a ponta cortada em bisel e misturar com o auxílio de vórtex. Incubou-se as amostras a 60 °C por 25 minutos.

**Tabela 14** – Preparo do Tampão de Extração A. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Produtos	[ ] Final em 100 mL	Volume para 100 mL
CTAB (g)	1%	1,0
PVP40 (g)	2%	2,0
Tween 20(g)	0,5%	0,5
[1M] Tris-HCl, pH 8,0 (mL)	50 mM	5,0
[0,5M] EDTA (mL)	20 mM	4,0
[5M] NaCl (mL)	1,1 M	22,0
[10M]LiCl (mL)	0,4 M	4,0
Água ultra pura q.s.p para fechar volume	-	100 mL

[ ]= Concentração

Remoção de proteínas da membrana: Após remover as amostras do banho maria resfriou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 600 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) e misturando gentilmente por inversão de tubo por 4 minutos para formar uma emulsão. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente para a separação das fases.

Precipitação do DNA: A fase aquosa superior (500 µL) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 250 µL de NaCl 5M (Vórtex), 750 µL de isopropanol gelado (-20 °C) (Vórtex) e manteve-se sob refrigeração (4 a 6 °C) por 15-20 minutos até começar a aparecer o DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, contribuindo para que o DNA migrasse para o fundo do tubo.

Lavagem do DNA: O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1000µL de etanol 75% gelado. As amostras foram submetidas rapidamente a centrifugação (Spin) que contribui para que o etanol presente na parede do tubo migrasse para o fundo, facilitando a sua remoção com o auxílio de uma micropipeta. O pellet de DNA foi secado à 25 °C por 30 minutos.

Degradação de RNA: O pellet foi ressuspenso em 50 µL de TE + RNase (20µg mL<sup>-1</sup>), incubado em banho maria à 37 °C por 15 minutos. Após, as amostras de DNA foram armazenadas à - 20 °C.

### **Protocolo 2 – (1%BME):**

Idem protocolo 1, com modificação de β-Mercaptoetanol para 1%.

**Protocolo 3 – (2%BME):**

Idem protocolo 1, com modificação de  $\beta$ -Mercaptoetanol para 2%.

**Protocolo 4 – (3%BME):**

Idem protocolo 1, com modificação de  $\beta$ -Mercaptoetanol para 3%.

**Protocolo 5 – (4%BME):**

Idem protocolo 1, com modificação de  $\beta$ -Mercaptoetanol para 4%.

**Protocolo 6 – (5%BME):**

Idem protocolo 1, com modificação de  $\beta$ -Mercaptoetanol para 5%.

**Protocolo 7 – (FENOL):**

Rompimento das paredes celulares: Material vegetal macerado em almofariz e pistilo em nitrogênio líquido, sempre com cuidado para não descongelar o macerado.

Remoção dos lipídeos da membrana celular e exposição do conteúdo celular: Em um tubo de 2 mL foi adicionado 0,2 g de tecido foliar macerado (~ 500  $\mu$ L), 620  $\mu$ L de tampão de extração B (Tabela 15) pré-aquecido em banho maria à 65 °C por 15 minutos + 6  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> de proteinase k (20mg mL<sup>-1</sup>) + 69  $\mu$ L de SDS 20% no macerado (Vórtex). Incubado à 65 °C por 1 hora mexendo de 20 em 20 minutos.

**Tabela 15** – Preparo do Tampão de Extração B. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Produtos	[ ] Final em 100 mL	Volume para 100 mL
[1M] Tris-HCl, pH 8,0 (mL)	50 mM	5,0
[0,5M] EDTA (mL)	20 mM	4,0
[5M] NaCl (mL)	1,1 M	22,0
CTAB (g)	2%	2,0
Água ultra pura q.s.p para fechar volume	-	100 mL

[ ]= Concentração

Remoção de proteínas da membrana: Após retirou-se do banho maria, permanecendo durante 5 minutos sobre a bancada para esfriar. Adicionou-se 315  $\mu$ L

de fenol e imediatamente 315  $\mu\text{L}$  de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) e misturou-se gentilmente por inversão de tubo por 4 minutos para formar uma emulsão. Centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente (25 °C) para separação das fases sólida e aquosa.

Precipitação do DNA: Transferiu-se a fase aquosa superior (500  $\mu\text{L}$ ) para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 333  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado e agitado vagarosamente. Nessa etapa foi possível visualizar uma nuvem de DNA. Centrifugou-se a 10000 rpm por 6 minutos para peletizar o DNA.

Lavagem do DNA: O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado 2 vezes com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75% gelado, em seguida centrifugou-se por 3 minutos e descartou-se o sobrenadante. O pellet de DNA foi secado à 25 °C por 2 horas.

Degradação de RNA: O pellet foi ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de TE + RNase (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubado em banho maria à 37 °C por 30 minutos.

Reprecipitação do DNA: O DNA foi reprecipitado com 5  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (3M) e 100  $\mu\text{L}$  de etanol 96%, ambos gelados (misturar rapidamente com auxílio de vórtex). Manteve-se a - 20 °C por 10 minutos. Centrifugou-se à 10000 rpm por 5 minutos para peletizar o DNA. Descartou-se o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet. Novamente o pellet de DNA foi lavado com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 75% gelado e secado à 25 °C por 30 minutos. O DNA foi ressuspenso com 50  $\mu\text{L}$  de TE + RNase (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), incubado em banho maria à 37°C por 10 minutos, e após, armazenado à - 20 °C.

### **Protocolo 8 – (3%BME+TA):**

Idem protocolo 7, diferindo pela utilização de  $\beta$ -Mercaptoetanol a 3% (30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) no lugar do fenol, adicionado diretamente no tampão de extração logo antes de sua utilização, sendo utilizado o tampão de extração A (Tabela 14).

### **Protocolo 9 – (3%BME+TB)**

Idem protocolo 7, diferindo apenas pela utilização de  $\beta$ -Mercaptoetanol a 3% (30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) no lugar do fenol, adicionado no tampão de extração logo antes de sua utilização.

### **Protocolo 10 – (3%BME+(TB+PVP40)):**

Idem protocolo 7, diferindo apenas pela utilização de  $\beta$ -Mercaptoetanol a 3% ( $30 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) no lugar do fenol, adicionado no tampão de extração logo antes de sua utilização, e o tampão de extração B (Tabela 15) acrescido de PVP40 3%.

A quantificação do DNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro, medindo-se a densidade óptica (OD) ou absorvância da solução no comprimento de onda de 260 nm em contraste com uma amostra de tampão TE livre de DNA, sendo calculada a concentração do DNA na amostra através da seguinte fórmula:

Equação 3. Cálculo da concentração de DNA.

$$\square \text{DNA}(\text{ng } \mu\text{L}^{-1}) = OD_{260} \times 50 \mu\text{g mL}^{-1} \times FD$$

Em que:  $OD_{260}$  é a leitura obtida no comprimento de onda de 260 nm, em que uma  $OD_{260}$  equivale a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DNA dupla hélice e FD é o fator de diluição utilizado para realizar a leitura no espectrofotômetro. O fator de diluição utilizado foi de 250 (2  $\mu\text{L}$  DNA: 498 água ultrapura) e a concentração do DNA é dada em  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  que equivale a  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os ácidos nucléicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Assim, através da razão entre DNA ( $OD_{260}$ ) e proteína ( $OD_{280}$ ) medida em espectrofotômetro foi verificada a qualidade do DNA extraído.

A qualidade do DNA também foi verificada através de corrida do DNA em gel de agarose 1% (1  $\mu\text{L}$  de *Safe DNA dye Avante*® + 4  $\mu\text{L}$  de DNA e 1  $\mu\text{L}$  de *Safe DNA dye Avante*® + 3  $\mu\text{L}$  marcador de peso molecular 1 Kpb), permanecendo no gel de corrida durante 1 hora a 85 V. Em seguida, o gel foi visualizado com luz ultravioleta em um transiluminador e a imagem gravada com o auxílio do fotodocumentador. Além disso, também foi verificada a interferência do DNA na reação da PCR, que foi executada como descrito no item 3.4.2 (PCR 1), utilizando o iniciador EME19514.

Os dados de razão  $OD_{260}/OD_{280}$  e concentração de DNA extraído foram submetidos à análise da variância e quando significativo, procedeu-se o teste de agrupamento de médias pelo método de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013).

### 3.4.2 Iniciadores

#### 3.4.2.1 Desenho de iniciadores

Pela ausência de marcadores moleculares específicos para *E. heterophylla*, foram confeccionados iniciadores degenerados para os genes *ALS* e *PROTOX* a partir de sequências das espécies *Ricinus communis* e *Manhiot esculenta*, que também pertencem à família *Euphorbiaceae*, utilizando o software online GeneFisher2 (GIEGERICH; MEYER; SCHLEIERMACHER, 1996).

Para a confecção de iniciadores específicos para o gene da *PROTOX*, a sequência de aminoácidos do gene *PPX1* (acesso DQ386115.1) de *A. tuberculatus* resistente aos herbicidas inibidores da *PROTOX* identificado por Patzoldt et al. (2006), obtida no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2014), foi submetido a um alinhamento local (tBLASTn) no banco de dados Phytozome contra o banco de dados de DNA das espécies *R. communis* e *M. esculenta*, sendo encontrada similaridade com as sequências 30076.m004545 e cassava4.1\_004987m, respectivamente (Tabela 16). De posse destas sequências, foi desenhado o iniciador >PPX1 (Tabela 17).

Com a sequência de aminoácidos do gene *PPX2L* (acesso DQ386116.1) de *A. tuberculatus* resistente ao *PROTOX* (PATZOLDT et al., 2006), obtida no banco de dados (NCBI, 2014) foi realizado um alinhamento local (tBLASTn) contra o banco de dados das espécies *R. communis* e *M. esculenta*, sendo encontrada similaridade com as sequências 30190.m010962 e cassava4.1\_005844m, respectivamente (Tabela 16). A partir do alinhamento dessas sequências foram desenhados os iniciadores degenerados (possuem uma ou mais bases diferentes na mesma posição) >PPX2 e >PPX2745 (Tabela 17).

**Tabela 16** – Resultado do alinhamento local (tBLASTn) a partir de sequências de aminoácidos do gene *PROTOX* (*PPX1* e *PPX2L*) de *A. tuberculatus* com *M. esculenta* e *R. communis*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Artigo	Acesso	Origem	Espécie	ID (%)	Score	E-value	Acesso
Patzoldt et al. (2006)	DQ386115.1	<i>A. tuberculatus</i>	<i>M. esculenta</i>	78,0	151,0	3,4E-34	cassava4.1_004987m
			<i>R. communis</i>	82,3	187,0	2,8E-45	30076.m004545
Patzoldt et al. (2006)	DQ386116.1	<i>A. tuberculatus</i>	<i>M. esculenta</i>	76,6	105,9	1,2E-20	cassava4.1_005844m
			<i>R. communis</i>	78,3	114,9	1,4E-23	30190.m010962

ID= Identidade.

**Tabela 17** – Iniciadores degenerados desenhados a partir de sequências de aminoácidos do gene *PROTOX* de *M. esculenta* e *R. communis*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Alinhamento	Acesso	Nome Iniciador	Sequência 5'-3'	<sup>1</sup> Nº D	TI	Posição	Amplicon (pb)	T <sub>m</sub>
<i>M. esculenta</i>	cassava4.1_004987m	>PPX1_F	CTATGCTAACCATGGTGGTGGA	0	22	394	395	55
<i>R. communis</i>	30076.m004545	>PPX1_R	TGTTTTGAAAGTGCCGCCAA	0	20	769		50
<i>M. esculenta</i>	cassava4.1_005844m	>PPX2_F	GTYAGTGGGCTTGCTGCA	2	18	69	348	51,5
<i>R. communis</i>	30190.m010962	>PPX2_R	CTCCACAAAAATGGCTCCAGA	0	22	395		53
		>PPX2745_F	GTGGAATGCAGACKCTAACTGA	2	22	727	745	54
		>PPX2745_R	AGATCAGCTGCTYGCATCCA	2	21	1451		53,5

Nº D= Número de degenerações, em que Y= C ou T; K= G ou T. TI = Tamanho do iniciador em pares de base (pb). T<sub>m</sub> = Temperatura de anelamento em °C. *Forward* (F) e *Reverse* (R).

Para a confecção dos iniciadores para o gene ALS foi realizado um alinhamento local (tBLASTn) no banco de dados Phytozome para *R. Communis* e *M. esculenta* a partir dos acessos do gene ALS de 10 diferentes espécies (Tabela 18), obtidos no banco de dados NCBI (2014). Para todos os alinhamentos realizados foi encontrada similaridade para o acesso cassava4.1\_003211m de *M. esculenta* e 30147.m014497 de *R. Communis* (Tabela 18). A partir do alinhamento entre essas duas sequências foi desenhado o iniciador >003211m e o iniciador degenerado >003211m812 (Tabela 19).

**Tabela 18** – Resultado do alinhamento local (tBLASTn) a partir de seqüências de aminoácidos do gene *ALS* de diferentes espécies com *M. esculenta* e *R. communis*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Artigo	Acesso	Origem	Espécie	ID (%)	Score	E-value	Acesso
Sibony e Rubin (2002)	AY124584.1	<i>Amaranthus blitoides</i>	<i>M. esculenta</i>	73,8	208,7	2,9E-52	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	74,6	223,1	8,1E-57	30147.m014497
Mcnaughton et al. (2005)	AF363370.1	<i>Amaranthus powellii</i>	<i>M. esculenta</i>	75,3	1166,3	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	76,4	1279,9	0,0	30147.m014497
Lamego et al. (2009)	EU622537.1	<i>Bidens subalternans</i>	<i>M. esculenta</i>	77,8	408,8	2,4E-112	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	78,6	403,4	6,1E-111	30147.m014497
Hanson et al. (2004)	AY428880.1	<i>Camelina microcarpa</i>	<i>M. esculenta</i>	75,4	1184,3	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	77,6	1364,6	0,0	30147.m014497
Warwick, Sauder e Beckie (2010)	GU271180.1	<i>Salsola tragus</i>	<i>M. esculenta</i>	74,4	1148,2	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	75,5	1216,8	0,0	30147.m014497
Cui et al. (2011)	FJ715633.1	<i>Descurainia sophia</i>	<i>M. esculenta</i>	75,2	1187,9	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	78,1	1407,9	0,0	30147.m014497
Sathasivan, Haughn e Murai (1990)	X51514.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>M. esculenta</i>	75,5	1213,2	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	78,1	1409,7	0,0	30147.m014497
Kolkman et al. (2004)	AY541451.1	<i>Helianthus annuus</i>	<i>M. esculenta</i>	76,5	1276,6	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	77,8	1398,9	0,0	30147.m014497
Scarabel et al. (2003)	AJ577316.1	<i>Papaver rhoeas</i>	<i>M. esculenta</i>	76,5	1200,5	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	77,2	1330,4	0,0	30147.m014497
Iwakami et al. (2014)	AB301496.1	<i>Sagittaria trifolia</i>	<i>M. esculenta</i>	70,1	769,5	0,0	cassava4.1_003211m
			<i>R. communis</i>	70,1	753,3	0,0	30147.m014497

ID= Identidade.

**Tabela 19** – Iniciadores degenerados desenhados a partir do alinhamento de seqüências de aminoácidos do gene *ALS* das espécies *M. esculenta* e *R. communis*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Alinhamento	Acesso	Nome Iniciador	Seqüência 5'-3'	Nº D	TI	Posição	Amplicon (pb)	T <sub>m</sub>
<i>M. esculenta</i>	cassava4.1_003211m	>003211m_F	CATCAGATGTGGGCTGCTCA	0	20	1437	380	54
<i>R. communis</i>	30147.m014497	>003211m_R	CGAGCAGCAGGTATTCCACA	0	20	1797		54
		>003211m812_F	TGATTCYGCTGAGATTGGGAA	2	21	1163	812	51,5
		>003211m812_R	TYCCATCACCTCAGTTATCACA	2	23	1952		54,5

Nº D= Número de degenerações, em que Y= C ou T. TI = Tamanho do iniciador em pares de base (pb). T<sub>m</sub> = Temperatura de anelamento em °C. *Forward* (F) e *Reverse* (R).

### 3.4.2.2 Transferibilidade de iniciadores SSRs

Foi realizada uma busca por marcadores moleculares baseados em PCR do tipo microssatélites (SSRs) no banco de dados do *Plant Genome DataBase Japan* (PGDB, 2014) para a família *Euphorbiaceae*. Nessa pesquisa foram encontrados 9025 marcadores SSRs genômicos descritos em trabalhos com as espécies: *Jatropha curcas*, *M. esculenta* e *R. communis*. Foram selecionados

iniciadores apenas da espécie *M. esculenta* por esta ser a espécie mais próxima filogeneticamente do gênero *Euphorbia* dentro da família *Euphorbiaceae* segundo LEE et al. (2011), sendo ainda mais próxima do que *R. communis* (ANEXO B).

Os iniciadores descritos por Sraphet et al. (2011) (Tabela 20) estavam agrupados em 23 grupos e os descritos por Kunkeaw et al. (2011) agrupados em 20 grupos (Tabela 20). Como parâmetro para a escolha dos 20 iniciadores considerou-se o grupo, a sua localização dentro de cada grupo e a temperatura de anelamento dos iniciadores, verificada com o auxílio do software *online* Oligo calc (*Oligonucleotide Properties Calculator*) (KIBBE, 2007).

**Tabela 20** – Lista de iniciadores SSR transferidos de *M. esculenta*. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Nome Iniciador	5'-3'	Sequência	T <sub>m</sub>	Nome	Artigo
CA050501	<i>Forward</i>	CTGTGTGAGGACTGGGATTG	60.5	CA0505	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GCTCTTGCAACCTTGAGACC	60.5		
CA050402	<i>Forward</i>	GGGTCTGGCATAAAGTGGAA	58.4	CA0504	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	CAGAAGCTGTTCGTGGCATA	58.4		
CA019303	<i>Forward</i>	ACTTTCACGTGGGTACAGGC	60.5	CA0193	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	TTCTCATCTCCACCTCCACC	60.5		
EME33204	<i>Forward</i>	CGTGGCTACACTCTTCTCCAC	63.2	EME332	Kunkeaw et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GAGACGGCTAGGGTTGGATAC	63.2		
EME51705	<i>Forward</i>	GTGAACGAGAATGAGGACACAA	60.1	EME517	Kunkeaw et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GAGCCGCAGAAGAGTTATCAAT	60.1		
MeES113106	<i>Forward</i>	GATCGGGACTATGACAGGGA	60.5	MeES1131	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	CTCCTTGAATGACTCCTCCG	60.5		
MeES065507	<i>Forward</i>	GGGATTAGATTACAATTCCAACCA	60.3	MeES0655	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	TGGAGTTGTACTGGGCCTTC	60.5		
CA065908	<i>Forward</i>	ACTACCTCGACAGAGCGCAT	60.5	CA0659	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	ACCTGTGGGTCCTCTGCTTA	60.5		
MeES069909	<i>Forward</i>	TTCCTGGGTTTCCTTGAAGTG	58.4	MeES0699	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GCAGGCACAATCTTCAGTCA	58.4		
CA005410	<i>Forward</i>	CTGTGTGAGGACTGGGATTG	60.5	CA0054	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	TGCCTTATCACTGATGCTCTCT	60.1		
EME42511	<i>Forward</i>	AAATTGGACAGGAGAGGTTGG	59.5	EME425	Kunkeaw et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	ACGGAGGAGAGTTGGATTTACA	60.1		
EME17112	<i>Forward</i>	CCAAGGAAGATGTGAAGGTG	58.4	EME171	Kunkeaw et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GGCAACGCAATTCTACTGCT	58.4		
CA002713	<i>Forward</i>	CTTACCAGCCTGCATTGTCA	58.4	CA0027	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	ATTCTCTGGAGAGATGGCA	58.4		
EME19514	<i>Forward</i>	GAAACTCCAGCACCAACAGA	58.4	EME195	Kunkeaw et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	ACACGGCCTCTTCTTCTATC	58.4		
CA036215	<i>Forward</i>	AAGTATCGCCTGCCTCTGAA	58.4	CA0362	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GTGCACTTTTATGTGCGAGC	58.4		
MeES083116	<i>Forward</i>	GCTTCAGACAATGCAACAGG	58.4	MeES0831	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GTTCTTACAATGCACTGCCA	58.4		
CA054517	<i>Forward</i>	ATGTCAAGAAACCCACAGC	58.4	CA0545	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	AGCCTGTTTCGGTACAATGG	58.4		
CA056518	<i>Forward</i>	TTCCTCCCTCTTTCTGCTTG	58.4	CA0565	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GGGAGGTGGTTTGTGAAACT	58.4		
CA030019	<i>Forward</i>	GTGTGATCCATCAGTGGCAG	60.5	CA0300	Sraphet et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	TCCATCCTGACCTCTGAACC	60.5		
EME33120	<i>Forward</i>	GAAGAGCATCAGGGCAAATC	58.4	EME331	Kunkeaw et al. (2011)
	<i>Reverse</i>	GATTGTAGGGATTGACGGCT	58.4		

### 3.4.2.3 Extração de DNA genômico, amplificação de DNA (PCR-SSR) e eletroforese

O DNA dos biótipos suscetível e resistente de *E. heterophylla* foi extraído empregando-se o protocolo de extração de DNA segundo Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas (1999), que se encontra descrito no protocolo 1 (0,2% BME) no item 3.4.1.

**PCR 1 (Normal):** Para cada amostra de reação da PCR utilizou-se 7,5 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão 10X (100 mM Tris; 500 mM KCl, pH 8,3), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µl de dNTPs (10 mM de cada nucleotídeo), 2 µl de cada iniciador “*Foward*” e “*Reverse*” (10 pmoles µL<sup>-1</sup>), 5 µl de DNA (100 ng µL<sup>-1</sup>) e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL<sup>-1</sup>), resultando em um volume final de 25 µL. Os microtubos de PCR foram colocados no aparelho termociclador e submetidos às seguintes etapas: Etapa 1: 95 °C por 5 minutos (uma vez); Etapa 2 (passo 1): 95 °C por 1 minuto; (passo 2): 53 °C por 1 minuto; (passo 3): 72 °C por 1 minuto; seguido de 35 ciclos os passos da etapa 2; Etapa 3: 72 °C durante 10 minutos. As amostras amplificadas foram mantidas à temperatura de 10 °C até serem submetidas à eletroforese.

**PCR 2 (Método touchdown):** Visando maximizar o rendimento dos iniciadores desenhados específicos para os genes *ALS* e *PROTOX* que são degenerados, foi realizada uma PCR pelo método *touchdown* intercalando ciclos de temperatura de anelamento que partem de 60 °C e vão até 53 °C. Para cada amostra de reação da PCR utilizou-se 7,5 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão 10X (100 mM Tris; 500 mM KCl, pH 8,3), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µl de dNTPs (10 mM de cada nucleotídeo), 2 µl de cada iniciador “*Foward*” e “*Reverse*” (10 pmoles µL<sup>-1</sup>), 5 µl de DNA (100 ng µl<sup>-1</sup>) e 0,5 µl de Taq DNA polimerase (5 U µl<sup>-1</sup>), resultando em um volume final de 25 µl. Os microtubos de PCR foram colocados no aparelho termociclador e submetidos às seguintes etapas: Etapa 1: 95 °C por 5 minutos (uma vez); Etapa 2 (passo 1): 95 °C por 1 minuto; (passo 2): 60 °C por 1 minuto; (passo 3): 72 °C por 1 minutos; Etapa 2: 15 ciclos; Etapa 3 (passo 1): 95 °C por 1 minuto; (passo 2): 56 °C por 1 minuto; (passo 3): 72 °C por 1 minutos; Etapa 3: 10 ciclos; Etapa 4 (passo 1): 95 °C por 1 minuto; (passo 2): 53 °C por 1 minuto; (passo 3): 72 °C por 1 minuto; Etapa 4: 10 ciclos; Etapa 5: 72 °C durante 10 minutos. As amostras

amplificadas foram mantidas à temperatura de 10 °C até serem submetidas à eletroforese.

Em um pedaço de *parafilm*® foi misturado 2 µL de corante *Safe DNA dye Avante*® com 10 µL do DNA amplificado de cada amostra, sendo então colocados os 12 µL de cada amostra nos poços do gel de agarose 2% contendo tampão TBE 1X (Tris 28 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,3) e submetidas à eletroforese horizontal, com uma tensão de 85V por aproximadamente 2 horas. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 100 pb DNA Ladder (50 pb – 1000 pb). Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas em luz ultravioleta em um transluminador e a imagem gravada com o auxílio do fotodocumentador.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Marcadores Moleculares

Os iniciadores desenhados para o gene *ALS* assim como para o gene *PROTOX* não amplificaram fragmentos de DNA (Figura 5). A ausência de bandas nas amostras sem DNA (negativas) indicam que os iniciadores não anelam neles mesmos, característica que é desejável (Figura 5).

A ausência de bandas nas amostras com DNA provavelmente decorre do fato de que os iniciadores não anelaram porque as regiões consenso existentes entre as sequências de *R. communis* e *M. esculenta* que serviram de base para a confecção dos iniciadores não são consenso para *E. heterophylla*.



**Figura 5** – Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de plantas  $F_1$  de *E. heterophylla* resistente aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso de iniciadores desenhados para o gene *ALS* (>003211m e >003211m812) e *PROTOX* (>PPX1, >PPX2 e >PPX2745). Marcador de peso molecular de 100 pb (M), amostra negativa sem DNA (-) e amostra positiva com DNA (+). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

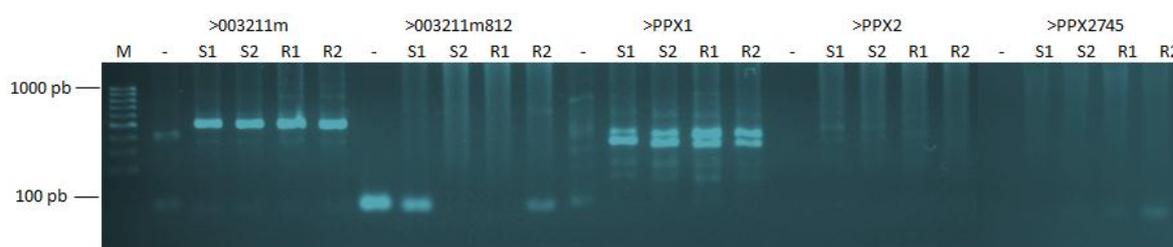
A fim de verificar se a temperatura era o fator determinante para a ausência de bandas foi empregada a técnica de PCR *touchdown*, com temperaturas de anelamento decrescentes de 60 °C, 56 °C e 53 °C.

Após a utilização da técnica PCR *touchdown*, apenas os iniciadores não degenerados >003211m e >PPX1 desenhados para o gene *ALS* e *PROTOX*, respectivamente, amplificaram e apresentaram repetibilidade dos resultados, no entanto, não revelaram bandas diferenciadoras (polimorfismo) entre o biótipo suscetível e resistente (Figura 6) que fosse possível verificar em gel de agarose. No caso dos iniciadores >003211m e >PPX1, uma possibilidade seria sequenciar as bandas amplificadas no biótipo resistente e no suscetível para verificar se há variação de um único nucleotídeo (SNP), variação esta que não pode ser detectada pelo tamanho das bandas.

Os iniciadores degenerados >003211m812, >PPX2 e >PPX2745 não amplificaram fragmentos de DNA de ambos os biótipos, mesmo alternando as temperaturas de anelamento (Figura 6). Geralmente iniciadores degenerados aumentam as probabilidades de obtenção de fragmentos, pois tem a possibilidade

de anelar em diversas regiões (ROCHA, 2005), no entanto, isso não foi constatado no presente trabalho.

Isso indica que as sequências desses iniciadores degenerados não estão presentes em *E. heterophylla*, possivelmente por que *E. heterophylla* pertence a gênero diferente de *R. communis* e *M. esculenta*, embora todas essas espécies pertençam à família *Euphorbiaceae*. Ou seja, apesar de mamona e mandioca serem filogeneticamente próximas de *E. heterophylla* e possuírem informação molecular disponível, a distância entre gêneros é considerada grande (BÁRBARA et al., 2007).



**Figura 6** – Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso de iniciadores desenhados para o gene *ALS* (>003211m e >003211m812) e *PROTOX* (>PPX1, >PPX2 e >PPX2745), através da técnica de PCR *touchdown* com temperaturas de anelamento de 60 °C, 56 °C e 53 °C. Marcador de peso molecular de 100 pb (M), amostra negativa sem DNA (-) e repetições (1 e 2). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

As mutações identificadas no gene *ALS* conferindo resistência de plantas daninhas a herbicidas são devidas substituição de um aminoácido por outro, em que a troca de um único nucleotídeo codifica um aminoácido diferente (HEAP, 2016). Da mesma forma, para resistência a inibidores da PROTOX, *A. artemisiifolia* apresenta uma mutação com substituição do aminoácido Arg<sub>98</sub>Leu (ROUSONELOS et al., 2012) e *A. tuberculatus* a deleção de um códon de Gly<sub>210</sub> (LEE; HAGER; TRANEL, 2008; POWLES; YU, 2010)

Desta forma, se uma mutação envolvendo a substituição de um nucleotídeo ou a deleção de um códon na sequência codificadora de *ALS* e *PROTOX* for responsável por conferir resistência aos herbicidas inibidores dessas enzimas, essa substituição não altera o tamanho do fragmento amplificado (amplicon) e a deleção altera o tamanho do fragmento apenas em 3 nucleotídeos. Por esse motivo, as bandas para o biótipo suscetível e resistente permanecem localizadas na mesma posição no gel de agarose, não sendo possível detectar a

mutação, pois apenas variações em torno de 10 pares de base no fragmento são possíveis de serem detectadas por meio de gel de agarose (MENKSEN; KAHL, 2005).

Entretanto, se os iniciadores desenhados para o gene *ALS* ou *PROTOX* tivessem o ponto de anelamento sobre a mutação (biótipo resistente) ou sobre a sequência normal (biótipo suscetível) haveria a amplificação de um fragmento em apenas um dos biótipos, que seria a banda diferenciadora.

No entanto, considerando a baixa probabilidade de flanqueamento dos iniciadores sobre o ponto de mutação e a necessidade de variações maiores que 10 pares de bases para detecção em gel de agarose, é evidente a necessidade do emprego do sequenciamento genético dos fragmentos amplificados nos biótipos suscetível e resistente para detectar uma substituição ou deleção de aminoácidos, já que a análise de fragmentos de DNA em sequenciador é muito mais precisa que géis de agarose ou poliacrilamida (GUPTA et al., 2010).

### 3.5.2 Transferibilidade de Marcadores SSR

Dos 20 iniciadores transferidos de *M. esculenta* para *E. heterophylla* apenas 10 amplificaram e nenhum apresentou o inconveniente de amplificar ele mesmo na amostra sem DNA (Dados não mostrados). Dessa forma, houve transferibilidade de 10 iniciadores de *M. esculenta* para *E. heterophylla*, que representa cerca de 50%, valor este considerado alto, já que segundo Bárbara et al. (2007) a transferibilidade entre espécies de gêneros diferentes, mas pertencentes à mesma família é cerca de 10%.

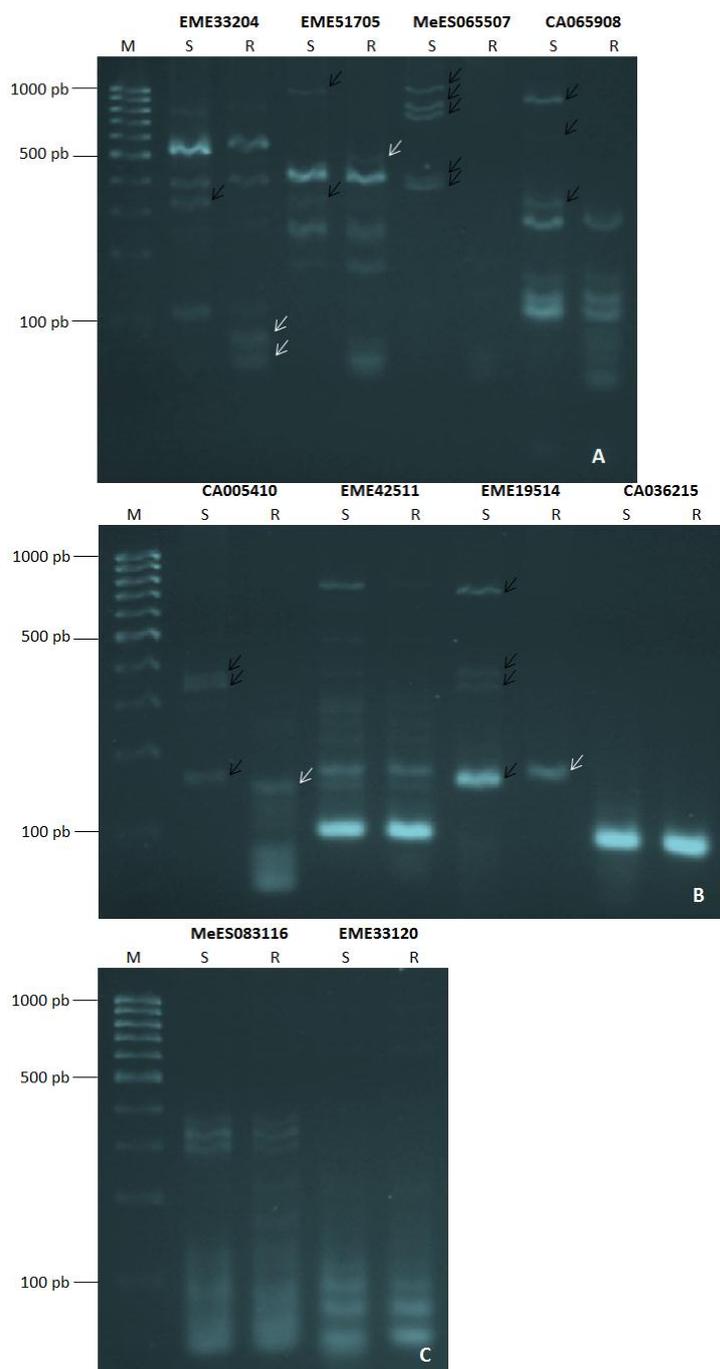
Resultados similares foram observados para diferentes gêneros da família Lamiaceae, em que a transferibilidade foi de 69,9% (KARACA et al., 2013), para diferentes gêneros da família Moraceae, a média de transferibilidade foi de 54,2% (MATHITHUMILAN et al., 2013) e entre gêneros da família Rosaceae, a média foi de 61,2% (FAN et al., 2013). Vários outros trabalhos evidenciam valores similares de transferibilidade de marcadores moleculares entre gêneros diferentes que pertencem à mesma família, mostrando sucesso obtido com a transferibilidade.

Sabe-se que para a obtenção de sucesso na transferibilidade de marcadores SSRs, as sequências das regiões de anelamento dos iniciadores devem ser conservadas, ou seja, homólogas entre os táxons (SANTANA, 2014) e quanto maior a homologia maior é a probabilidade de transferibilidade dos iniciadores (VARSHNEY et al., 2005). Assim, pode-se afirmar que existem regiões genômicas conservadas entre *M. esculenta* e *E. heterophylla* em que os iniciadores transferidos anelaram, além de regiões não conservadas.

Destes 10 iniciadores, apenas EME33204, EME51705, MeES065507, C065908, CA005410 e EME19514 apresentaram polimorfismo entre os biótipos suscetível e resistente (Figura 7). O iniciador MeES065507 foi o único marcador dominante, pois amplificou apenas fragmentos de DNA de um dos biótipos, neste caso do biótipo suscetível.

Os iniciadores EME42511, CA036215, MeES083116 e EME33120 geraram bandas tanto para o biótipo suscetível quanto para o resistente, mas o mesmo padrão de bandas foi observado para ambos os biótipos, portanto esses iniciadores não foram polimórficos (Figura 7).

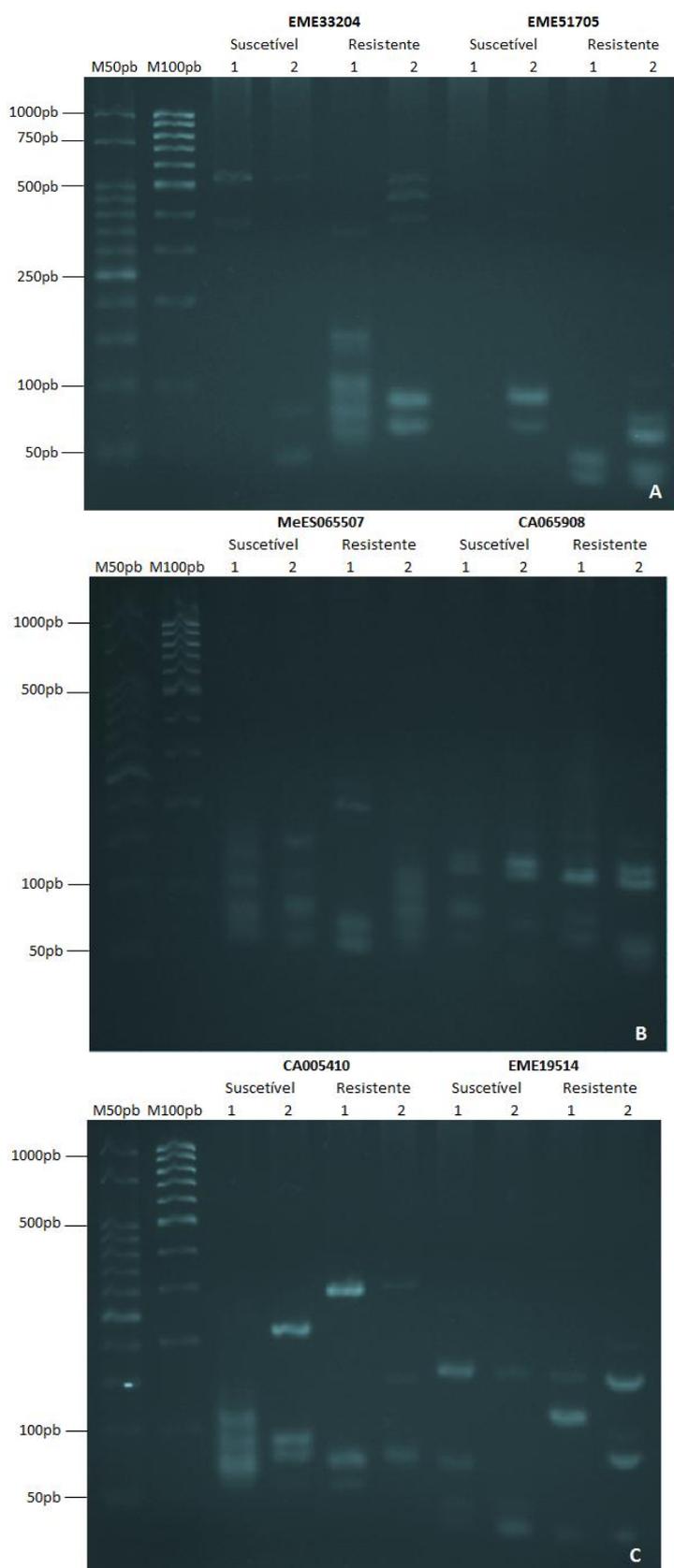
A diferença na intensidade das bandas entre os biótipos é atribuída ao número de cópias do fragmento de DNA, observado quando o iniciador não é específico.



**Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose (2,5%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com iniciadores do tipo SSR transferidos de *M. esculenta*. Marcador de peso molecular de 100 pb (M). Utilizou-se temperatura de anelamento de 53 °C e 35 ciclos na PCR. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Ao testarem-se duas amostras de DNA de cada um dos biótipos, dos 6 iniciadores que revelaram polimorfismo, não foi constatada repetibilidade no padrão de bandas (Figura 8). Assim, é possível inferir que os iniciadores EME33204, EME51705, MeMS065507, C065908, CA005410 e EME19514 não são específicos,

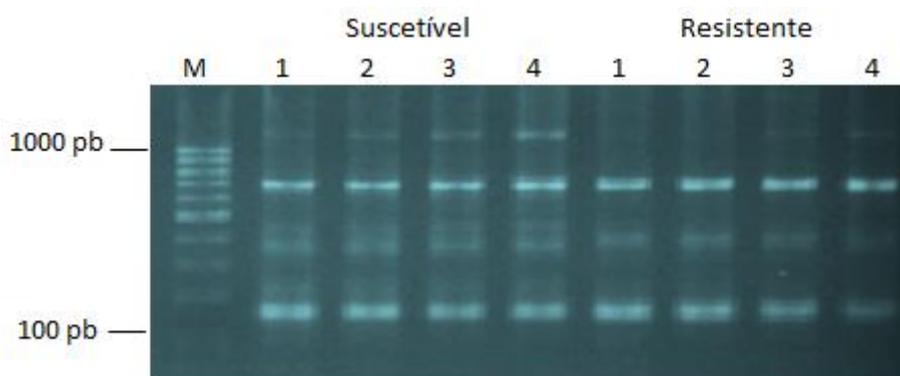
ou seja, nem sempre anelam no mesmo local no genoma. Assim, em cada PCR um padrão de bandas diferente é observado, com variação na intensidade das bandas em função do número de vezes que o iniciador anela em determinado local e amplifica.



**Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose (3%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com iniciadores do tipo SSR transferidos de *M. esculenta*. Marcador de peso molecular de 50

pb (M50pb) e 100 pb (M100pb). Utilizou-se temperatura de anelamento de 58 °C e 40 ciclos na PCR, com duas repetições para cada um dos biótipos. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Observou-se que o padrão de bandas gerado pelo iniciador EME19514 se manteve para os biótipos suscetível e resistente de *E. heterophylla*, com maior ou menor intensidade das mesmas (Figura 9). Porém, esse iniciador testado anteriormente nas mesmas condições da PCR apresentou diferentes padrões de bandas amplificadas (Figura 7), também observado com o aumento da temperatura de anelamento de 53 °C para 58 °C (Figura 8).



**Figura 9** – Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível (S) e resistente (R) aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso do iniciador SSR EME19514 transferidos de *M. esculenta*. Marcador de peso molecular de 100 pb (M). Utilizou-se temperatura de anelamento de 53 °C e 35 ciclos na PCR, com quatro repetições para cada um dos biótipos. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Os resultados obtidos na transferibilidade dos marcadores SSRs evidenciam que a utilização desses iniciadores é limitada, pois alguns apresentaram polimorfismo, mas não são específicos e por este motivo não apresentam repetibilidade do padrão de bandas amplificadas, fato que limita estudos posteriores.

### 3.5.3 Protocolos de Extração de DNA

O protocolo de extração 0,2%BME apresentou concentração de DNA de 7083 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , estatisticamente superior aos demais protocolos pelo teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade de erro (Tabela 21).

Dessa forma, a concentração de 0,2% de  $\beta$ -Mercaptoetanol foi suficiente para evitar o efeito oxidativo dos polifenóis, resultado também constatado

por Arriel et al. (2002) na extração de DNA de gergelim (*Sesamum indicum* L.). Portanto, a elevação da concentração de  $\beta$ -Mercaptoetanol acima de 0,2% para a extração de DNA de *E. heterophylla* é desnecessária, acarretando apenas em aumento dos custos de extração.

Concentração de DNA de 3.695, 3.245 e 2.828 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  foram obtidas, respectivamente pelos protocolos 1%BME, 3%BME+(TB+PVP40), e 2%BME que não diferiram estatisticamente entre si, sendo inferiores ao protocolo 0,2%BME e superiores aos demais protocolos (Tabela 21).

As menores concentrações de DNA extraídos foram obtidas através dos protocolos 3%BME+TA, 3%BME+TB, 4%BME, 5%BME, FENOL e 3%BME que não diferiram estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade (Tabela 21). Esses protocolos além de proporcionarem baixa quantidade de DNA extraído, utilizam uma maior quantidade de produtos ou em maior concentração, fato que encarece o custo de extração.

Verificou-se também que o aumento da concentração de  $\beta$ -Mercaptoetanol, nos protocolos adaptados de Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas (1999) manteve a qualidade do DNA aferida pela razão  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ , mas proporcionou decréscimo na quantidade de DNA extraído (Tabela 21). Segundo (BORGES et al., 2009) o aumento da concentração de  $\beta$ -Mercaptoetanol aumenta a pureza do DNA extraído mas reduz a quantidade.

**Tabela 21** – Médias estimadas dos protocolos de extração para concentração DNA e razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, com agrupamento de médias pelo teste de Scott Knott a 5%. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Protocolo	[ ] DNA (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Razão OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
0,2%BME	7083 a	2,14 c
1%BME	3695 b	2,14 c
3%BME+(TB+PVP40)	3245 b	2,23 b
2%BME	2828 b	2,13 c
3%BME+TA	2602 c	2,19 b
3%BME+TB	2367 c	2,05 d
4%BME	2096 c	2,10 c
5%BME	2047 c	2,12 c
FENOL	1859 c	2,30 a
3%BME	1634 c	2,12 c
CV (%)	1,87	15,89

Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott, em nível de 5 % de probabilidade de erro. [ ] = Concentração.

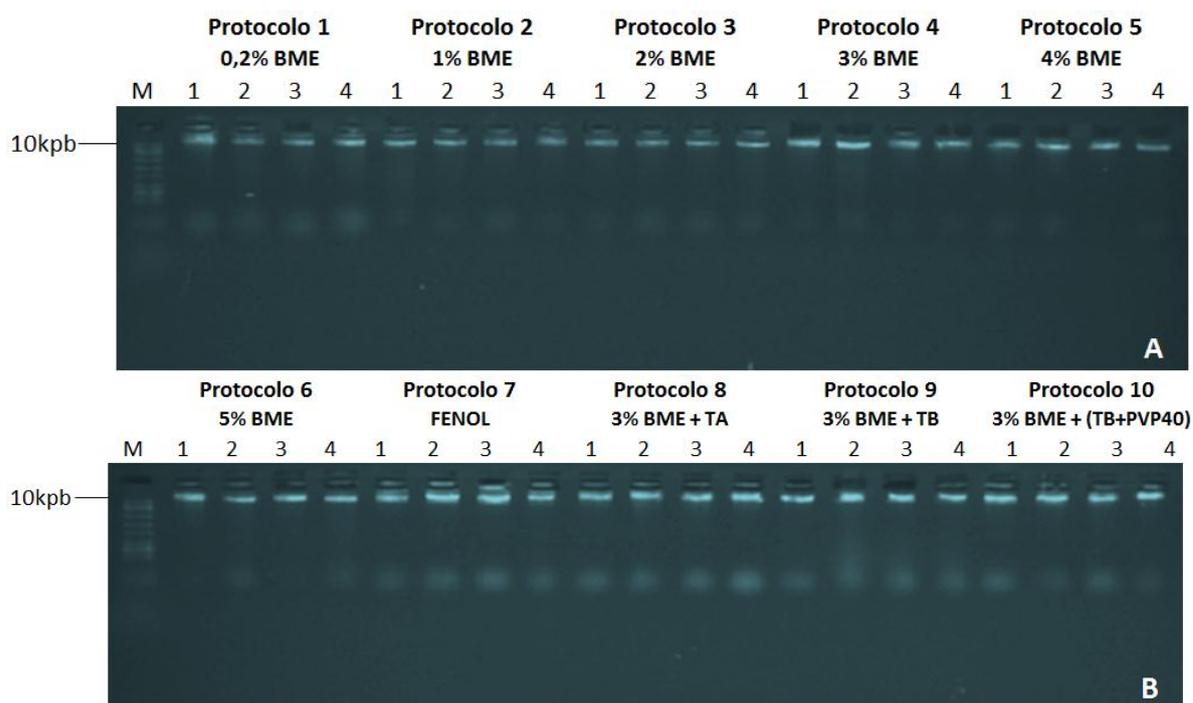
A menor razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> para o DNA extraído foi obtida com o protocolo 3%BME+TB e a maior razão obtida pelo protocolo FENOL, enquanto que os demais protocolos apresentaram valores intermediários (Tabela 21).

Os valores de razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, em todos os protocolos ficou acima de 2, situando-se fora da faixa de pureza considerada ótima para DNA que é entre 1,8 a 2,0 (CORRÊA et al., 2013). Segundo Nelson e Cox (2004), valores superiores à faixa ótima de pureza indicam contaminação do DNA por fenol e polifenóis que são fortemente absorvidos em comprimento de onda de 280 nm.

A constatação de valores superiores à faixa ótima de pureza se deve ao fato dos produtos utilizados nos protocolos não serem capazes de remover totalmente os compostos fenólicos durante a extração, que se justifica pela elevada quantidade de compostos fenólicos produzidos por *E. heterophylla* (CRONQUIST, 1981).

Problemas com araste vertical no gel e retenção no poço do gel não foram observados para os protocolos testados (Figura 10), indicando que o DNA extraído não foi degradado por DNAses, não houve quebra mecânica durante a extração com clorofórmio e a remoção de polissacarídeos foi eficiente, que segundo Romano e Brasileiro (1999) e Roso e Vidal (2010) são fatores responsáveis por ocasionar tais problemas.

A pequena migração do DNA no gel evidenciada para todos os protocolos (Figura 10) é atribuída a grande quantidade de DNA utilizada (4  $\mu$ L) para cada amostra, à alta concentração do gel de agarose (1%), ao baixo tempo de corrida no gel (45 min) e a intensidade da voltagem aplicada (85 V), que são fatores capazes de reduzir a velocidade de corrida do DNA no gel de agarose (OLIVEIRA et al., 2007; ROMANO; BRASILEIRO, 1999).



**Figura 10** – Eletroforese em gel de agarose (1%) de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível aos inibidores da ALS/PROTOX, obtido a partir dos 10 protocolos de extração, com quatro repetições por protocolo. Utilizou-se 4  $\mu$ L de DNA para cada amostra, que permaneceram migrando no gel por 45 minutos à 85 Volts. Marcador de peso molecular de 10 kpb (M). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Os DNAs extraídos a partir dos protocolos 0,2%BME, 1%BME, 2%BME, 3%BME, 4%BME e 5%BME adaptados de Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas (1999) não apresentaram interferência na PCR, evidenciando assim a capacidade de extraírem DNA com qualidade (Figura 11). A ausência ou baixa intensidade de bandas é atribuída à baixa especificidade do iniciador utilizado na PCR.

Considerando-se os protocolos adaptados de Murray e Thompson (1980), com modificações de Roso e Vidal (2010) não foi observada interferência na PCR para o DNA extraído pelos protocolos 3%BME+TA e 3%BME+(TB+PVP40)

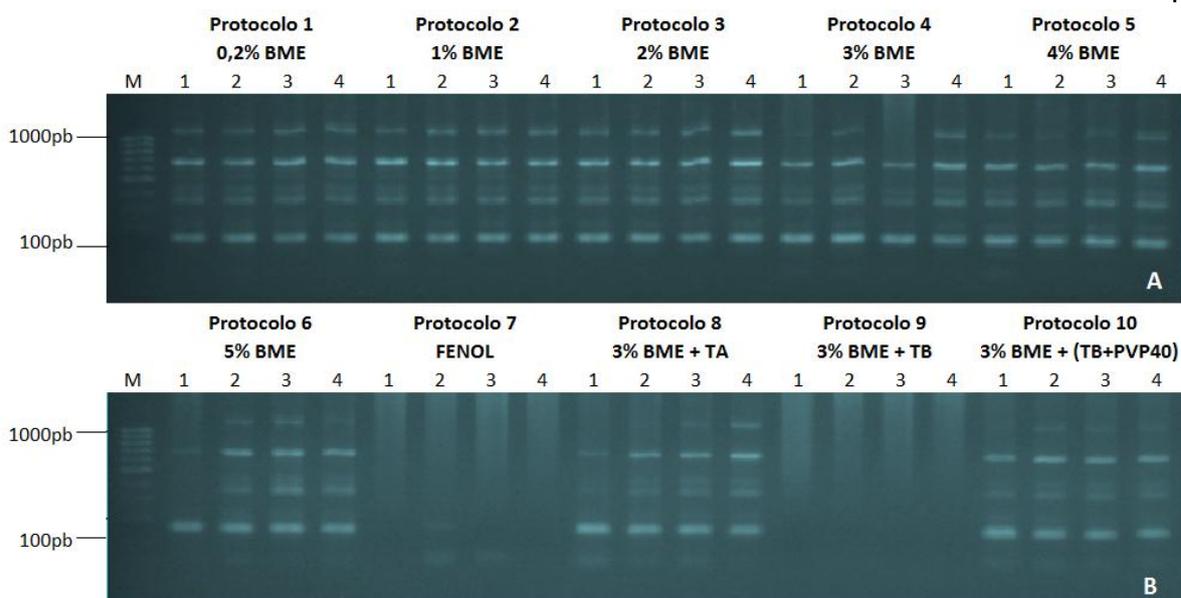
(Figura 11). No entanto, este último proporcionou maior quantidade de DNA extraído (Tabela 21). Vale ressaltar que em ambos os protocolos havia presença de PVP40 a 2%. Já, o DNA extraído pelos protocolos FENOL e 3%BME+TB ocasionaram problemas na PCR, constada pela ausência de bandas amplificadas (Figura 11).

A extração de DNA com o protocolo FENOL resultou em contaminação do DNA por resíduo de fenol ou compostos fenólicos que não foram eficientemente removidos pelo fenol, já que não havia presença de PVP40 no tampão de extração, resultando na ausência de bandas no perfil de eletroforese e na alta razão  $OD_{260}/OD_{280}$  de 2,30. Vale ressaltar que o pellet de DNA com aspecto marrom característico de contaminação por polifenóis não foi observado neste protocolo, indicando maior probabilidade de que a contaminação tenha sido causada apenas pelo fenol.

Mesmo apresentando razão  $OD_{260}/OD_{280}$  de 2,05, o DNA extraído a partir do protocolo 3%BME+TB apresentou contaminação por compostos fenólicos, ocasionando a inibição da PCR, possivelmente por que não havia adição de PVP40 no tampão de extração. Segundo Romano e Brasileiro (1999), a contaminação por compostos fenólicos impossibilita amplificações através de técnicas de PCR, comprometendo a reprodutibilidade das análises. Esses compostos oxidam o DNA de forma irreversível e a contaminação pode ser evidenciada pela presença de coloração marrom no DNA (ROMANO; BRASILEIRO, 1999), aspecto do DNA observado apenas neste protocolo.

Constatou-se através do protocolo de extração 3%BME+(TB+PVP40) que a adição PVP40 à 2% no tampão de extração é suficiente para proporcionar extração de DNA com qualidade para PCR, solucionando o problema de contaminação por compostos fenólicos observado no protocolo 3%BME+TB. Isto é possível, pois a adição de antioxidantes como PVP40 evitam o efeito oxidativo dos polifenóis (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

É importante destacar que em todos os protocolos adaptados de Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas (1999) havia presença de PVP40 a 2% no tampão de extração, fato que possivelmente contribuiu para não haver contaminação por compostos fenólicos.



**Figura 11** – Perfil eletroforético em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação de DNA genômico de *E. heterophylla* suscetível aos inibidores da ALS/PROTOX, com o uso do iniciador SSR EME19514 transferidos de *M. esculenta*, para os diferentes protocolos de extração com quatro repetições por protocolo. Marcador de peso molecular de 100 pb (M). Utilizou-se temperatura de anelamento de 53 °C e 35 ciclos na reação de PCR. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Entre os protocolos de extração adaptados de Murray e Thompson (1980), com modificações de Roso e Vidal (2010), o protocolo 3%BME+(TB+PVP40) não apresentou problemas de contaminação por compostos fenólicos, extraíndo DNA de boa qualidade, no entanto, em quantidade foi 54,18% menor do que a obtido pelo protocolo 0,2%BME, além de necessitar muito tempo para a execução das etapas que leva de aproximadamente 7-8 horas, praticamente o dobro do tempo demandado para a extração através do protocolo 0,2%BME que é de aproximadamente 4 horas.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho é possível inferir que o protocolo de extração 0,2%BME adaptado de Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas (1999) é o mais indicado para extração de DNA da espécie *E. heterophylla*, pois não foram observados problemas de contaminação por polifenóis, proporcionando garantia de alta quantidade e qualidade do DNA extraído, além de necessitar pouco tempo para a execução das etapas de extração.

### 3.6 CONCLUSÕES

Os iniciadores não degenerados >003211m e >PPX1 desenhados para os genes *ALS* e *PROTOX* amplificaram com sucesso, no entanto, o polimorfismo não foi detectado em gel de agarose, sendo necessário o sequenciamento para detectar as modificações na sequência de DNA.

A transferibilidade de iniciadores microssatélites de *M. esculenta* para *E. heterophylla* foi de 50%, no entanto, apenas 30% iniciadores foram polimórficos além de serem pouco específicos, não havendo repetibilidade do padrão de bandas amplificado.

O protocolo de extração 0,2%BME adaptado de Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas (1999) é o mais indicado para extração de DNA da espécie *E. heterophylla*.

A adição de polivinilpirrolidona (PVP40) no tampão de extração soluciona problemas de contaminação do DNA por compostos fenólicos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência múltipla de *Euphorbia heterophylla* aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX é um problema para as lavouras agrícolas. No Brasil foram confirmados registros dessa espécie com resistência múltipla na região Sudoeste do Paraná, que possivelmente esteja se disseminando para novas áreas. Visando o controle efetivo dessas populações com resistência e a evolução dessa resistência é necessário elucidar os efeitos genéticos que estão envolvidos e o nível de resistência. Esse conhecimento permite a adoção de técnicas de manejo adequadas para controlar populações já resistentes e evitar ou retardar o surgimento de novas populações resistentes. Diante disso, a presente dissertação trata de um conjunto de estudos envolvendo a resistência múltipla de *E. heterophylla* aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX, sobre o qual faz-se algumas considerações.

No primeiro capítulo da dissertação confirmou-se que a resistência múltipla de *E. heterophylla* aos inibidores da ALS e PROTOX é conferida por dois genes nucleares e dominantes que apresentam dominância completa, e a resistência simples aos inibidores da ALS e PROTOX é condicionada por um único gene nuclear e dominante com dominância completa. Isso gera implicações práticas importantes, pois os genes de resistência podem ser transferidos aos descendentes via semente ou mais rapidamente através do fluxo de pólen pela fecundação cruzada. Além disso, confirmou-se que a elevação da dose desses herbicidas não proporciona aumento nos níveis de controle, sendo esta prática agronomicamente injustificável.

Com o segundo capítulo constatou-se que os marcadores moleculares desenhados para os genes *ALS* e *PROTOX* não amplificaram ou não foram polimórficos para os biótipos suscetível e resistente. A transferibilidade de marcadores SSR de *M. esculenta* foi de 50%, considerada alta, indicando que o genoma dessa espécie é próximo ao do *E. heterophylla* e que pode servir de base para novos estudos. Também, constatou-se que a adição de polivinilpirrolidona (PVP40) no tampão de extração é suficiente para solucionar o problema de contaminação do DNA por compostos fenólicos e que o protocolo de extração 0,2%BME adaptado de Doyle e Doyle (1987), com modificações de Lefort e Douglas

(1999) é o mais indicado para extração de DNA da espécie *E. heterophylla*, pois não ocasiona contaminação por polifenóis, garante alta quantidade e qualidade do DNA extraído e demanda pouco tempo para extração.

Vale ressaltar que novos estudos em nível molecular devem ser conduzidos para elucidar se uma mutação nas enzimas ALS e PROTOX é responsável por conferir a resistência simples e múltipla a esses mecanismos de ação em *E. heterophylla*. Assim, o próximo passo a ser dado em novos trabalhos é o sequenciamento dos fragmentos amplificados nos biótipos suscetível e resistente que se encontram localizados na mesma posição no gel, a fim de detectar pequenas variações como a substituição ou deleção de nucleotídeos.

Outra possibilidade é sequenciar os fragmentos amplificados nos biótipos suscetível e resistente, principalmente os maiores, com tamanho em torno de 1000 pares de bases, pois quanto maior o tamanho do fragmento de DNA sequenciado maior a probabilidade de desenvolvimento de um marcador capaz de detectar uma mutação. Após o sequenciamento, marcadores moleculares podem ser desenhados a partir do alinhamento das sequências de DNA de *Euphorbia heterophylla* sequenciadas e serem testados nos biótipos S e R. Em seguida, sequenciar as bandas geradas para os dois biótipos, alinhá-las com o auxílio de um programa computacional para então verificar a existência de substituição ou deleção de nucleotídeos, identificando a mutação que confere a resistência e a posição em que se localiza na enzima.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JHONSON, A.; LEVWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1268 p.

AMARAL, Luís André. **Estudos genéticos e morfológicos de biótipos resistentes e susceptíveis de *Euphorbia heterophylla* L. (Amendoim-bravo)**. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

ARRIEL, N. H. C.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; CAPELOTO, A.; DI MAURO, S. M. Z.; DI MAURO, A. O. Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico, em gergelim. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 525-535, 2002.

BÁRBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3759-3767, 2007.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2002. 377p.

BELL, M. S.; HAGER, A. G.; TRANEL, P. J. Multiple resistance to herbicides from four site-of-action groups in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v. 61, n. 3, p. 460-468, 2013.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006.

BORGES, A. ROSA, M. S.; RECCHIA, G. H.; QUEIROZ-SILVA, J. R.; BRESSAN, E. A.; VEASEY, E. A. CTAB methods for dna extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 4, p. 529-534, 2009.

BOUTSALIS, P.; KAROTAM, J.; POWLES, S. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. **Pest Management Science**, v. 55, n. 5, p. 507-516, 1999.

BOUTSALIS, P.; POWLES, S. B. Inheritance and mechanism of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Sonchus oleraceus* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 2, p. 242-7, 1995.

BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA Jr, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo das plantas daninhas**. Editora: Omnipax, 2011. 348 p.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y. C.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, 2003.

CARVALHO; S. J. P. OVEJERO, R. F. L. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da protox (Grupo E). CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. J. P.; CATANEO, A. C.; CARVALHO, J. C. e MOREIRA, M. S. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Piracicaba – SP: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas, 2008.

CHEN, H.; RANGASAMY, M.; TAN, S. Y.; WANG, H.; SIEGFRIED, B. D. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. **PLOS One**, v. 5, n. 8, e11963, 2010.

CHIPMAN, D.; BARAK, Z.; SCHLOSS, J. V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1385, p. 401-419, 1998.

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

CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L. RESISTÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS: Definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. J. P.; CATANEO, A. C.; CARVALHO, J. C. e MOREIRA, M. S. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Piracicaba – SP: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas, 2008.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. J. P.; CATANEO, A. C.; CARVALHO, J. C.; MOREIRA, M. S. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Piracicaba – SP: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas, 2008.

CORRÊA, A. A. P.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; PAZETO, M. S. R.; VIANNA, V. F.; DI MAURO, A. O. Análise quali-quantitativa da extração de DNA em *Jatropha* spp. **Científica**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 235-245, 2013.

COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 8, n. 1, p. 8-12, 1990.

CRONQUIST, A. **An Integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, 1981. 1262 p.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CUI, L. C.; ZHANG, C. X.; WEI, S. H.; ZHANG, H. J.; LI, X. J.; ZHANG, Y. Q.; WANG, G. Q. Acetolactate synthase gene proline (197) mutations confer tribenuron-methyl resistance in flixweed (*Descurainia sophia*) populations from China. **Weed Science**, v. 59, n. 3, p. 376-379, 2011.

DAL MAGRO, T. D.; REZENDE, S. T. de; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, V.; SILVA, A. A. da; FALKOSKI, D. L. Propriedades enzimáticas da enzima ALS de *Cyperus difformis* e mecanismo de resistência da espécie ao herbicida pyrazosulfuron-ethyl. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 12, p. 2439-2445, 2010.

DAYAN, F. E.; OWENS, D. K.; TRANEL, P. J.; PRESTON, C.; DUKE, S. D. Evolution of resistance to phytoene desaturase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors – state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1358-1366, 2014.

DÉLYE, C.; BOUCANSAUD, K. A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. **Weed Research**, v. 48, p. 97-101, 2008.

DEVINE, M. D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, v. 19, p. 881- 889, 2000.

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

EMBRAPA - Trigo. **Evolução da Resistência**. Documentos online. Passo Fundo – RS. 2006. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do58\\_5.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do58_5.htm)>. Acesso em: 11 set. 2015.

FAN, L.; ZHANG, M. Y.; LIU, Q. Z.; LI, L. T.; SONG, Y.; WANG, L. F.; ZHANG, S. L., WU, J. Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae Species. **Plant molecular biology reporter**, v. 31, n. 6, p. 1271-1282, 2013.

FELIPPI, C. L. et al. Ocorrência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* e *Bidens spp* resistentes a inibidores da enzima ALS e da PROTOX, no sudoeste e oeste do Paraná e oeste de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24, 2004, Águas de São Pedro - SP. **Resumos...** Piracicaba: SBCPD, 2004.

FERREIRA, E. A. **Translocação do glyphosate em biótipos de plantas daninhas e características competitivas do azevém**. 2008. 60 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

FRANS, R.; TALBERT, R.; MARX, D.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and plant responses to weed control practices. In: CAMPER, N. D. **Research methods in weed science**. Third Edition. Champaign: Southern Weed Science Society, p. 29-46, 1986.

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

GIEGERICH, R.; MEYER, F.; SCHLEIERMACHER, C. **GeneFisher** - software support for the detection of postulated genes, 1996.

GOULART, I. C. G. R.; MEROTTO JUNIOR, A.; NUNES, A. L.; BERED, F. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1175-1181, 2011.

GOUVEIA, J. J. S.; REGINATO, L. C. A. EXTRAÇÃO DE DNA. In: REGINATO, L. C. A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. S.; VENERONI, G. B.; GASPARIN, G. **Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudoeste, p. 3-4, 2007.

GRESSEL, J.; SEGEL, L. A. The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. **Journal of Theoretical Biology**, v. 75, n. 1, p. 349-371, 1978.

GRESSEL, J.; LEVY, A. Agriculture: the selector of improbable mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 12215-16, 2006.

GUPTA, V. et al. Gel versus capillary electrophoresis genotyping for categorizing treatment outcomes in two antimalarial trials in Uganda. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 19, 2010.

GUTTIERI, M. J.; EBERLEIN, C. V.; MALLORY-SMITH, C. A.; THILL, D. C.. Molecular genetics of target-site resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. 1996. In: BROWN, T. M.; WASHINGTON, D. C. **Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance**.: American Chemical Society, 1996.

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

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: < <http://weedscience.org/>>. Acesso em: 03 jan. 2016.

INOUE, M. H.; OLIVEIRA Jr, R. S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: OLIVEIRA Jr, Rubem S.; CONSTANTIN, Jamil; INOUE, Miriam H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba – PR: Omnipax, 2011.

IWAKAMI, S.; WATANABE, H.; MIURA, T.; MATSUMOTO, H.; UCHINO, A. Occurrence of sulfonylurea resistance in *Sagittaria trifolia*, a basal monocot species, based on target-site and non-target-site resistance. **Weed Biology and Management**, v. 14, p. 43-49, 2014.

JACOBS, J. M.; JACOBS, N. J.; DUKE, S. O. Protoporphyrinogen Destruction by Plant Extracts and Correlation with Tolerance to Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 55, p. 77-83, 1996.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 424-429, 1996.

JONES, N. et al. Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytol.**, v. 183, n. 4, p. 935-966, 2009.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

KARACA, M.; INCE, A. G.; AYDIN, A.; AY, S. T. Cross-genera transferable e-microsatellite markers for 12 genera of the Lamiaceae family. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 93, n. 8, p. 1869-79, 2013.

KARP, Gerald. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2005. 786 p.

KASHI, Y.; KING, D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends Genet**, v. 22, p. 253-259, 2006.

KIBBE, W. A. '**OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator**'. (2007) Disponível em: <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2014. Disponível em: <[http://www.hrac-br.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/02/Texto\\_reisistencia\\_herbicidas1.pdf](http://www.hrac-br.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/02/Texto_reisistencia_herbicidas1.pdf)>. Acesso em: 15 set. 2015.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1999.

KOLKMAN, J. M.; SLABAUGH, M. B.; BRUNIARD, J. M.; BERRY, S.; BUSHMAN, B. S.; OLUNGU, C.; MAES, N.; ABRATTI, G.; ZAMBELLI, A.; MILLER, J. F.; LEON, A.; KNAPP, S. J. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 1147-1159, 2004.

KUNKEAW, S.; YOOCHA, T.; SRAPHET, S.; BOONCHANAWIWAT, A.; BOONSENG, O.; LIGHTFOOT, D. A.; TRIWITAYAKORN, K.; TANGPHATSORNRUANG, S. Construction of a genetic linkage map using simple sequence repeat markers from expressed sequence tags for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Molecular Breeding**, v. 27, p. 67-75, 2011.

LAMEGO, F. P.; CHARLSON, D.; DELATORRE, C. A.; BURGOS, N. R.; VIDAL, R. A. molecular basis of resistance to ALS-inhibitor herbicides in Greater Beggarticks. **Weed Science**, v. 57, n. 5, p. 474-481, 2009.

LEE, E. K.; JARAMILLO, A. C.; KOLOKOTRONIS, S. O.; KATARI, M. S.; STAMATAKIS, A.; OTT, M.; CHIU, J. C.; LITTLE, D. P.; STEVENSON, D. WM.; MCCOMBIE, W. R.; MARTIENSSEN, R. A.; CORUZZI, G.; DESALLE, R. A functional phylogenomic view of the seed plants. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 12, p. 1002411, 2011.

LEE, R. M.; HAGER, A. G.; TRANEL, P. J. Prevalence of a novel resistance mechanism to PPO-inhibiting herbicides in Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v. 56, n. 3, p. 371-375, 2008.

LEFORT, F.; DOUGLAS, G. C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species Acer, Fraxinus, Prunus and Quercus. **Annals of Forest Science**, v. 56, n. 3, p. 259-263, 1999.

LERMONTOVA, I.; GRIMM, B. Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. **Plant Physiology**, v. 122, p. 75-83, 2000.

**LIBRE OFFICE**. Versão 4.0.3.3. Disponível em: < <http://www.libreoffice.org/> >. Acesso em: 15 mar. 2015.

LITT, M.; LUTY, J. A Hypervariable microsatellite revealed by In vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401, 1989.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 6. ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum. 2006. 175 p.

MACHADO, A. B.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; PATEL, F.; CIESLIK, L. F.; DEBASTIANI, F. Rendimento de grãos de feijão e níveis de dano econômico sob dois períodos de competição com *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 41-48, 2015.

MACKENZIE, S. A. Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. **Trends Cell Biology**, v. 15, p. 548–554, 2005.

MALACINSKI, George M. **Fundamentos de biologia molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 439 p.

MARIANI, F.; VARGAS, L.; AGOSTINETTO, D.; SILVA, D. R. O.; FRAGA, D. S.; SILVA, B. M. Herança da resistência de *Lolium multiflorum* ao iodosulfuron-methyl sodium. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p. 351-356, 2015.

MATHITHUMILAN, B.; KADAM, N. N.; BIRADAR, J.; REDDY, S. H.; ANKAIAH, M.; NARAYANAN, M. J.; KHURANA P.; SHESHSHAYEE, S. M. Development and characterization of microsatellite markers for *Morus* spp. and assessment of their transferability to other closely related species. **BMC plant biology**, v. 13, p. 194, 2013.

MATIELLO, R. R.; RONZELLI Jr, P.; PURÍSSIMO, C. Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agronômicos e genéticos. In: CURSO DE MANEJO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS. Ponta Grossa 2. ed. 1999. **Anais...** Ponta Grossa: AEACG, p. 27-40, 1999.

MATSUMOTO, H.; KASHIMOTO, Y.; WARABI, E. Basis for common chickweed (*Stellaria media*) tolerance to oxyfluorfen. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 64, n. 1, p. 47-53, 1999.

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de dna de tecido de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12-17, 2000.

MCCOURT, J. A.; PANG, S. S.; KING-SCOTT, J.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 569-73, 2006.

MCNAUGHTON, K. E.; LETARTE, J.; LEE, E. A.; TARDIF, F. J. Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, v. 53, n. 1, p. 17-22, 2005.

MEGA, N. O.; REVERS, L. F. Developing a rapid, efficient and low cost method for rapid DNA extraction from arthropods. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1563-1570, 2011.

MENKSEN, K.; KAHL, G. **Handbook of plant genome mapping**. v. 1. Weinheim: Wiley, 2005. 403 p.

MEROTTO Jr, A.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152 p.

MESCHEDE, D. K.; OLIVEIRA Jr, R. S.; CONSTANTIN, J.; SCAPIM, C. A. Período anterior a interferência de plantas daninhas em soja: estudo de caso com baixo estande e testemunhas duplas. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 22, n. 2, p. 239-246, 2004.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Revista: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 2003.

MOELLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi. fruit bodies. and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MONQUEIRO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; DIAS, C. T. S. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 419-425, 2000.

MULUGETA, D.; MAXWELL, B. D.; FAY, P. K.; DYER, W. E. Kochia (*Kochia scoparia*) pollen dispersion, viability and germinationn. **Weed science**, Champaign, v. 42, n. 4, p. 548-552, 1994.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. **Nucleic acid research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

**NCBI** - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> >. Acesso em: 25 jul. 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, principles of biochemistry**. 4 ed. New York: Worth Publishers, 2004. 1340 p.

NEVE, P.; BUSI, R.; RENTONC, M.; VILA-AIUB, M. M. Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1385-1393, 2014.

NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; VARGAS, L. RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS (Grupo B). In: CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. J. P.; CATANEO, A. C.; CARVALHO, J. C.; MOREIRA, M. S. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Piracicaba – SP: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas, 2008.

NUNES, A. L.; SCHAEGLER, C. E.; LAMEGO, F. P. Rotações de culturas: exemplos, causas dos benefícios e perspectivas. In: VIDAL, R. A. **Interações positivas entre plantas que aumentam a produtividade agrícola**. Porto Alegre: Evangraf, 105-124 p., 2014.

OHMES, G. A.; KENDIG, J. A. Inheritance of an ALS cross-resistant common cocklebur (*Xanthium strumarium*) biotype. **Weed Technology**, v. 13, n. 1, p. 100-103, 1999.

OLDACH, K. H.; PECK, D. M.; CHEONG, J.; WILLIAMS, K. J.; NAIR, R. M. Identification of a chemically induced point mutation mediating herbicide tolerance in annual medics (*Medicago* spp.). **Annals of Botany**, v. 101, p. 997-1005, 2008.

OLIVEIRA Jr, R. S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA Jr, Rubem S.; CONSTANTIN, Jamil; INOUE, Miriam H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba – PR: Omnipax, 2011.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, Eder J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152 f. Tese (Doutorado em Agronomia) –

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudoeste, 2007. 43 p.

OSSOWSKI, S.; SCHNEEBERGER, K.; LUCAS-LLEDÓ, J. I.; WARTHMAN, N.; CLARK, R. M.; SHAW, R. G.; WEIGEL, D.; LYNCH, M. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 327, p. 92-94, 2010.

OVEJERO, R. F. L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; VARGAS, L. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. (Eds.). Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho p. 185-214, 2004.

PANG, S. S.; GUDDAT, L. W. DUGGLEBY, R. G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 9, p. 7639-7644, 2003.

PATZOLDT, W. L.; HAGER, A. G.; MCCORMICK, J. S.; TRANEL, P. J. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12329-12334, 2006.

**PGDB** (Plant Genome DataBase Japan). Disponível em: <[http://pgdbj.jp/en/dna-marker-linkage-map/plant-marker-list.html?line=50&i\\_max=4&search%5B%5D=Euphorbiaceae&sel%5B%5D=0&search%5B%5D=&sel%5B%5D=0&search%5B%5D=&sel%5B%5D=0&search%5B%5D=&sel%5B%5D=0&spec=40&mk\\_type=54](http://pgdbj.jp/en/dna-marker-linkage-map/plant-marker-list.html?line=50&i_max=4&search%5B%5D=Euphorbiaceae&sel%5B%5D=0&search%5B%5D=&sel%5B%5D=0&search%5B%5D=&sel%5B%5D=0&search%5B%5D=&sel%5B%5D=0&spec=40&mk_type=54)>. Acesso em: 25 ago. 2014.

PINTO, M. F. F. C. **Caracterização de locos microssatélites em duas espécies de abelhas da região amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina)**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.

PRIMMER, C. R.; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Rapid frogs. **Conservation Genetics**, n. 3, p. 445-449, 2002.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, 2008. 464 p.

RIGGINS, C. W.; TRANEL, P. J. Will the *Amaranthus tuberculatus* resistance mechanism to PPO-inhibiting herbicides evolve in other *Amaranthus* species? **International Journal of Agronomy**, v. 2012, p. 7, 2012.

RITSCHER, P. S.; LINS, T. C. L.; TRISTAN, R. L.; BUSO, G. S. C.; BUSO, J. A.; FERREIRA, M. E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 9. p. 2-14, 2004.

RITTER, R. L.; COBLE, H. D. Penetration, translocation, and metabolism of acifluorfen in soybean (*Glycine max*), common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*), and common cocklebur (*Xanthium pensylvanicum*). **Weed Science**, v. 29, n. 4, p. 474-480, 1981.

RIZZARDI, M. A.; VIDAL, R. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 20, n. 1, p. 149-158, 2002.

ROCHA, Kliger K. F. **Um sistema computacional para diagnosticar viroses de plantas usando a técnica de PCR com construção de “Primers espécies-específicos”**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

ROSO, A. C.; VIDAL, R. A. Determinação de protocolo para extração de DNA da espécie daninha *Euphorbia heterophylla* L. (EPHHL). In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Ribeirão Preto – SP, 2010.

ROUSONELOS, S. L.; LEE, R. M.; MOREIRA, M. S.; VANGESSEL, M. J.; TRANEL, P. J. Characterization of a Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) population resistant to ALS- and PPO-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 60, n. 3, p. 335-344, 2012.

SANTANA, Ariane R. **Transferibilidade e desenvolvimento de sistema multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites para *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae)**. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia

Molecular) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2014.

SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G. W.; MURAI, N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia*. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 8, 1990.

SCARABEL, L.; CARRARO, N.; SATTIN, M.; VAROTTO, S. Molecular basis and genetic characterisation of evolved resistance to ALS-inhibitors in *Papaver rhoeas*. **Plant Science**, v. 166, n. 2004, p. 703-709, 2004.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, Berlin, v. 109, p. 365-371, 2000.

SEIXAS, Fabiana. **Marcadores Moleculares**. Pelotas – RS: Universidade Federal de Pelotas, 2011. 19 p.

SHANER, D. L. Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection and management. **Weed Science**, v. 44, p. 405-411, 1999.

SIBONY, M.; RUBIN, B. Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (Prostrate pigweed). **Planta**, v. 216, n. 2003, p. 1022-1027, 2002.

**SIGMAPLOT** - Exact Graphy for Exact Science. Version 12.0, 2014.

SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R. **Biologia e controle de plantas daninhas**. Viçosa: DFT/UFV, 2002.

SRAPHET, S.; BOONCHANAWIWAT, A.; THANYASIRIWAT, T.; BOONSENG, O.; TABATA, S.; SASAMOTO, S.; SHIRASAWA, K.; ISOBE, S.; LIGHTFOOT, D. A.; TANGPHATSORNRUANG, S.; TRIWITAYAKORN, K. SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, p. 1161-1170, 2011.

STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, London, v. 365, p. 274-276, 1993.

TRANEL, P. J.; HORVATH, D. P. Molecular biology and genomics: new tools for weed science. **BioScience**, v. 59, n. 3, p. 207–215, 2009.

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

TRANDEL, P. J.; WRIGHT, T. R.; HEAP, I. M. **Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors**. Online. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 03 jan. 2016.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da ALS. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152 p.

TREZZI, M. M.; FELIPPI, C. L.; MATTEI, D.; SILVA, H. L.; NUNES, A. L.; DEBASTIANI, C.; VIDAL, R. A.; MARQUES, A. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 40, 2005.

TREZZI, M. M.; NUNES, A. L.; PORTES, E. S. Interação entre inseticida organofosforado e herbicidas inibidores da protox e sua implicação na resistência de *Euphorbia heterophylla*. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 6, p. 423-428, 2009.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; KRUSE, N. D. Resistência de *Euphorbia heterophylla* a herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier, 2009.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; KRUSE, N. D.; SILVA, R. P.; GUSTMANN, M. S.; FRANCHIN, E. Local de absorção de fomesafen como mecanismo de resistência em biótipo de *Euphorbia heterophylla* resistente aos inibidores da PROTOX. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 139-148, 2009.

TREZZI, M. M.; XAVIER, E.; VIDAL, R. A.; PORTES, E.; ROSIN, D.; VOTRI, M.; LAMEGO, F. Teste rápido de imersão foliar de *Euphorbia heterophylla* para confirmação de resistência a herbicidas inibidores da PROTOX e da ALS. **Planta Daninha**, v. 29, p. 901-912, 2011a.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; KRUSE, N. D.; GUSTMAN, M. S.; XAVIER, E.; ROSIN, D. DEDORDI, G. F. Eletrolite Leakage as a technique to diagnose *Euphorbia heterophylla* biotypes resistant to PPO-inhibitors herbicides. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 655-662, 2011b.

TREZZI, M. M.; MACHADO, A. B.; XAVIER, E. Soja: Impacto do leiteiro e estratégias de manejo. **Cultivar**, n. 183, p. 8-10, 2014.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A. A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2001.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A. A. Técnicas de cruzamentos controlados em *Euphorbia heterophylla* L. **Bragantina**, v. 58, n. 1, p. 23-27, 1999.

VARGAS, L.; NOHATTO, M. A.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M. A.; PAULA, J. M.; POLIDORO, E.; TOLEDO, R. E. Práticas de manejo e a resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da ALS e tolerância ao glyphosate no Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 427-432, 2013.

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

VARGAS, Leandro. **Resistência de *E. heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS/AHAS)**. 2000. 58 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

VARSHNEY, R.; GRANER, K. A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 1, 2005.

VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Evangraf, 1997. 165 p.

VIDAL, R. A.; FLECK, N. C. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 15, n. 2, 1997.

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

VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr, A.; FLECK, N. G. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas de menor risco para desenvolver problemas. Curso de manejo e resistência de plantas daninhas aos herbicidas. Ponta Grossa, 2. ed., 1999. **Anais...** Ponta Grossa: AEACG, p. 68-72, 1999.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. Resistência de plantas daninhas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactato sintase (ALS). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 31-42, 2002.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M.; HERNANDES, G. C.; FLECK, N. G.; MEROTTO JR., A.; TREZZI, M. M. A field survey of crop management practices and distribution of

ALS resistant *Euphorbia heterophylla* in two states in Southern Brazil. **Planta Daninha**, v. 22, p. 403-410, 2004.

VIDAL, Ribas A. **Ação dos herbicidas: absorção, translocação e metabolização**. Porto Alegre: Ribas A. Vidal, 2002.

VIEIRA, Viviane C. **Caracterização molecular de acessos de capim-colchão (*Digitaria nuda*) e resposta à ametrina**. 2007. 58 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2007.

WANG, G. X.; LIN, Y.; LI, W.; ITO, M.; ITOH, K. A mutation confers *Monochoria vaginalis* resistance to sulfonylureas that target acetolactate synthase. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 80, n. 2004, p. 43-46, 2004.

WARABI, E.; USUI, K.; TANAKA, Y.; MATSUMOTO H. Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. **Peste Mangement Science**, v. 57, n. 8, p. 743-748, 2001.

WARWICK , S. I.; SAUDER, C. A.; BECKIE, H. J. Acetolactate synthase (ALS) target-site mutations in ALS inhibitor-resistant russian thistle (*Salsola tragus*). **Weed Science**, v. 58, n. 3, p. 244-251, 2010.

WATANABE, N.; CHE, F. S.; IWANO, M.; TAKAYAMA, S.; NAKANO, T.; YOSHIDA, S.; ISOGAI, A. Molecular Characterization of photomixotrophic tobacco cells resistant to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Plant Physiology**, v. 118, p. 751-758, 1998.

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**, v. 55, n. 2, p. 83-90, 2007.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: distribuição e genética de biótipos do estado do Paraná. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, p. 85-92, 2004.

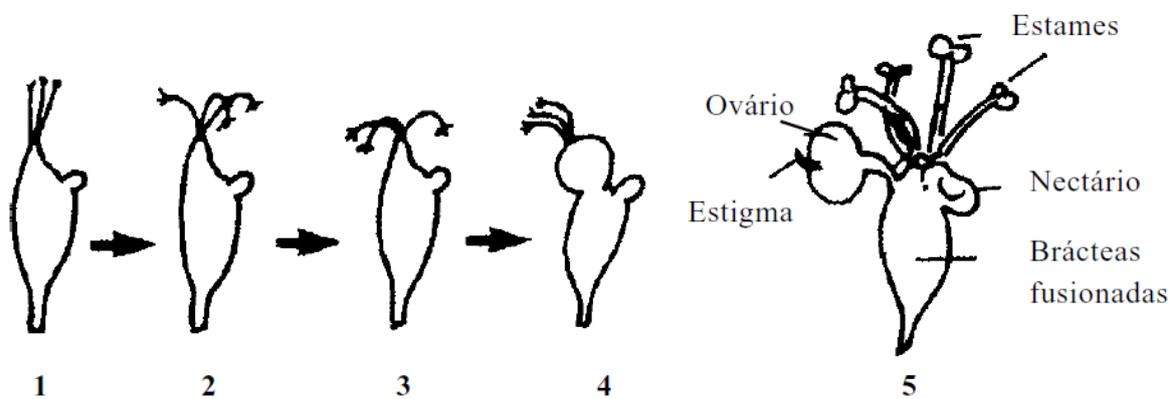
WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A.; NETO, J. F. B. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, 2003.

XAVIER, E. et al. Acetolactate synthase activity in *Euphorbia heterophylla* resistant to ALS and protox inhibiting herbicides. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 867-874, 2013.

XAVIER, Elouize. **Mecanismos de resistência e resposta a herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX em *Euphorbia heterophylla* L.** 2014. 211 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

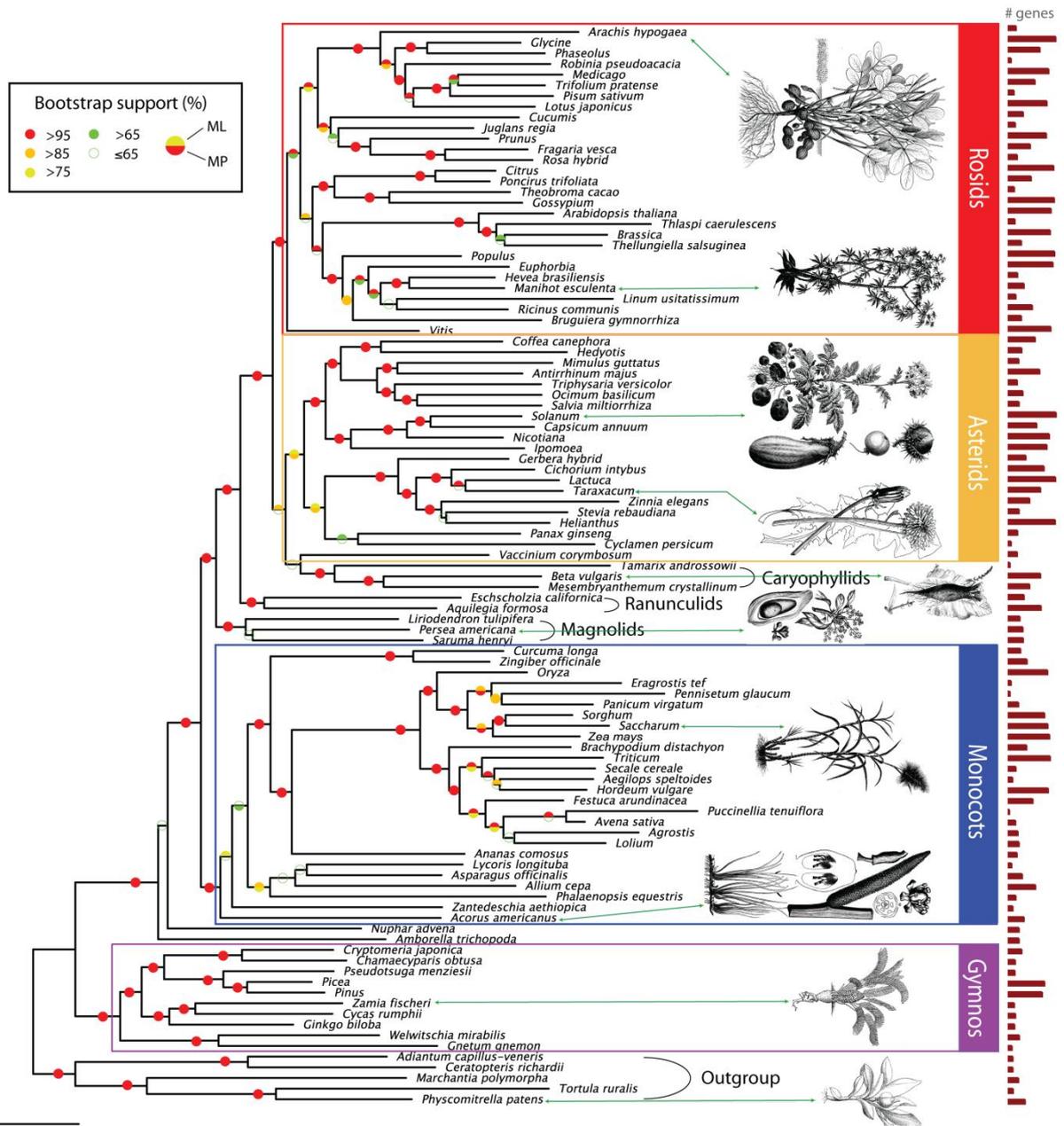
YU, Q.; HAN, H.; POWLES, S. B. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1229-1236, 2008.



ANEXO A - Estádios de desenvolvimento floral de *Euphorbia heterophylla* L.

**Fonte:** (VARGAS; BORÉM; SILVA, 1999).

ANEXO B – Filograma de agrupamento entre espécies de diferentes gêneros, família, ordem e clado.



Fonte: LEE et al. (2011).

## APÊNDICES

Apêndice A - Resumo da análise de variância da resposta à dose do herbicida fomesafen aos 7, 14 e 21 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2015.

FV	GL	QME		
		7	14	21
Doses	6	3824,1269**	4067,6190**	4223,175**
Biótipo	2	22297,1428**	24689,5238**	26882,860**
Doses x Biótipo	12	632,6984**	702,8571**	771,746**
Resíduo	84	50,4761	43,8095	45,714
CV (%)	-	19,89	18,00	18,06
Média	-	35,71	36,76	37,42

\*\* significativo em 1% de probabilidade, pelo teste F; FV= Fator de variação; GL= Graus de liberdade; QME= Quadrado médio do erro; CV = Coeficiente de variação.

Apêndice B - Resumo da análise de variância da resposta à dose do herbicida fomesafen para a variável matéria verde (MV) e matéria seca (MS) aos 21 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2015.

FV	GL	QME	
		MV	MS
Doses	6	0,02536**	0,00169**
Biótipo	2	0,61961**	0,00859**
Doses x Biótipo	12	0,01448**	0,00033**
Resíduo	84	0,00025	0,00004
CV (%)	-	5,31	17,03
Média	-	0,296	0,037

\*\* significativo em 1% de probabilidade, pelo teste F; FV= Fator de variação; GL= Graus de liberdade; QME= Quadrado médio do erro; CV = Coeficiente de variação.

Apêndice C – Resumo da análise de variância da resposta à dose do herbicida imazethapyr aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2015.

FV	GL	QME			
		7	14	21	28
Doses	6	4057,7778**	5168,2539**	5930,4762**	6916,5079**
Biótipo	2	3805,7143**	6572,3809**	8640,9524**	13220,0000**
Doses x Biótipo	12	526,8254**	753,4921**	857,6190**	1082,2222**
Resíduo	84	12,3809	19,0476	18,0952	18,57143
CV (%)	-	25,13	19,67	16,24	13,71
Média	-	14,00	22,19	26,19	31,42

\*\* significativo em 1% de probabilidade, pelo teste F; FV= Fator de variação; GL= Graus de liberdade; QME= Quadrado médio do erro; CV = Coeficiente de variação.

Apêndice D – Resumo da análise de variância da resposta à dose do herbicida imazethapyr para a variável matéria verde (MV) e matéria seca (MS) aos 28 dias após aplicação. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2015.

FV	GL	MV	MS
		QME	
Doses	6	0,6745**	0,0389**
Biótipo	2	2,1576**	0,0038**
Doses x Biótipo	12	0,1156**	0,0051**
Resíduo	84	0,0068	0,0006
CV (%)	-	11,35	13,88
Média	-	0,727	0,175

\*\* significativo em 1% de probabilidade, pelo teste F; FV= Fator de variação; GL= Graus de liberdade; QME= Quadrado médio do erro; CV = Coeficiente de variação.

Apêndice E – Resumo da análise de variância dos protocolos de extração de DNA. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2015.

FV	GL	[ ] DNA (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Razão OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
Protocolos	9	10074744**	0,0203**
Resíduo	30	219258	0,0016
CV (%)	-	15,89	1,87
Média	-	2946	2,15

\*\* significativo em 1% de probabilidade, pelo teste F; FV= Fator de variação; GL= Graus de liberdade; QME= Quadrado médio do erro; CV = Coeficiente de variação; [ ] = Concentração.