

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CARLOS ALEXANDRE MAROCHIO

Estimativa da diversidade genética e análise da estrutura de populações de
espécies de *Conyza*.

Maringá
2014

CARLOS ALEXANDRE MAROCHIO

Estimativa da diversidade genética e análise da estrutura de populações de espécies de *Conyza*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Pires da Silva Machado

Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Claudete Aparecida Mangolin

Maringá
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M354e Marochio, Carlos Alexandre
Estimativa da diversidade genética e análise da estrutura de populações de espécies de *Conyza* / Carlos Alexandre Marochio. -- Maringá, 2014.
x, 56 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Pires da Silva Machado.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Claudete Aparecida Mangolin.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2014.

1. Plantas daninhas - Buva (*Conyza* ssp.) - Resistência. 2. Herbicida glyphosate. 3. Marcadores moleculares - Microssatélites. I. Machado, Maria de Fátima Pires da Silva, orient. II. Mangolin, Claudete Aparecida, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 22.ed. 632.5

SOI-002048

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARLOS ALEXANDRE MAROCHIO

Estimativa da diversidade genética e análise da estrutura de populações de espécies de *Conyza*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Pires da Silva Machado
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Rubem Silvério de Oliveira Júnior
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Fernando Storniolo Adegas
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa soja

Prof. Dr. Jamil Constantin
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Claudete Aparecida Mangolin
Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 27 de Fevereiro de 2014
Local da defesa: Anfiteatro 01, Bloco J45

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e sabedoria, dando força nessa caminhada profissional.

Aos meus pais Edvaldo Marochio e Elza Navarenski Marochio pela dedicação e auxílio.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela atenção, ensinamentos, conselhos e pela grande contribuição para a realização desse trabalho.

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Claudete Aparecida Mangolin, pela atenção e contribuição na realização desse trabalho.

À minha orientadora da University of California, Davis, nos Estados Unidos, Marie Jasieniuk por ter aceitado a minha estadia em seu laboratório para a realização dessa pesquisa.

Ao meu amigo Marcelo L. Moretti, pela ajuda em poder conseguir realizar a pesquisa na University of California, juntamente pela dedicação e disponibilização de material para a realização do trabalho, auxílio nos momentos de dificuldades nos Estados Unidos e aos grandes momentos de descontração.

Ao meu amigo Rafael Munhoz Pedroso, da University of California, pelo auxílio e atenção nos momentos de dificuldades, e aos grandes momentos de descontração.

Ao meu amigo Maycon Ruiz Bevilaqua pela contribuição na realização desse trabalho.

As minhas amigas Gizelly Santos e Alessandra Constantin Francischini pela contribuição e ajuda na instalação do experimento.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e nos Estados Unidos.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do trabalho.

Estimativa da diversidade genética e análise da estrutura de populações de espécies de *Conyza*.

RESUMO

A proposta no presente estudo foi investigar a variabilidade genética em nível molecular, e verificar a forma como estão geneticamente estruturadas as espécies de *Conyza canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*, analisando o polimorfismo em locos de sequências simples repetidas (locos SSR) de DNA, também denominados locos de microssatélites. Foram analisadas amostras de *C. canadensis*, sensíveis e resistentes ao glifosato, e *C. bonariensis* resistentes e com resistência múltipla, coletadas no Vale Central da Califórnia (USA), e amostras de *C. sumatrensis* sensíveis e resistentes, coletadas em seis municípios do Estado do Paraná (Brasil), usando os *primers* HW02, HW06, HW07, HW09, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09 e HWSSR11 para analisar o polimorfismo nos 12 locos microssatélites. O maior número de alelos (26) foi encontrado em *C. sumatrensis*. A maior proporção de locos microssatélites polimórficos (91,67%) foi observada nas plantas da espécie *C. bonariensis*, mas o número de alelos por locos ($N_a = 2,1667$), número efetivo de alelos ($N_e = 1,9388$), e heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,4291$), também foi maior nas amostras de *C. sumatrensis*, indicando que a diversidade genética é maior na espécie *C. sumatrensis*. As amostras de *C. canadensis* apresentaram a menor diversidade genética. A divergência genética entre as três espécies de *Conyza* foi alta ($F_{ST} = 0,25$), indicando que estas são populações geneticamente estruturadas. Os *primers* HW07, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09 e HWSSR11 foram indicados para diferenciar as três espécies de *Conyza*. A proporção de locos microssatélites polimórficos foi maior nas amostras de *C. canadensis* resistentes (*R*), mas o número efetivo de alelos e os valores de H_o e H_e foram equivalentes nos genótipos sensíveis (*S*) e resistentes, indicando que *C. canadensis-S* e *C. canadensis-R* tem o mesmo potencial para colonizar novas áreas. Os valores de H_o e H_e também foram equivalentes nos genótipos de *C. sumatrensis-S* e *C. sumatrensis-R*. As amostras de *C. sumatrensis* formaram populações geneticamente estruturadas ($F_{ST} = 0,4822$). Nos municípios de Campo Mourão e Cafelândia há exemplares de *Conyza* com características em nível molecular, para locos microssatélites, de *C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*, e exemplares que compartilham alelos

características das espécies, indicando a ocorrência das três espécies e sugerindo que há troca de alelos entre as três espécies de *Conyza* na referida região.

Palavras-chave: Microssatélites, resistência, diversidade genética.

Genetic diversity and structure of populations in *Conyza* species.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the genetic variability at the molecular level, and check how they are genetically structured species *Conyza canadensis*, *C. bonariensis* and *C. sumatrensis*, analyzing polymorphism loci in simple sequence repeat (SSR loci) of DNA, also called microsatellite loci. Samples of *C. canadensis* were analyzed, sensitive and resistant to glyphosate, and *C. bonariensis* resistant and dual resistance, collected in the Central Valley of California (USA), and samples of *C. sumatrensis* sensitive and resistant collected in six counties of the State of Paraná (Brazil), using the HW02, HW06, HW07, HW09, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09 and HWSSR11 primers to analyze the polymorphism in 12 loci microsatellites. The large number of alleles (26) was found in *C. sumatrensis*. The largest proportion of polymorphic microsatellite loci (91.67%) was observed in the plants of the species *C. bonariensis*, but the number of alleles per locus ($N_a = 2.1667$), effective number of alleles ($N_e = 1.9388$), and mean expected heterozygosity ($H_e = 0.4291$) was also higher in samples of *C. sumatrensis*, indicating that the genetic diversity in the species is longer *C. sumatrensis*. Samples of *C. canadensis* showed the lowest genetic diversity. The genetic divergence between the three species of *Conyza* was high ($F_{ST} = 0.25$), indicating that these populations are genetically structured. The HW07, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09 and HWSSR11 primers were shown to differentiate the three species of *Conyza*. The proportion of polymorphic microsatellite loci was higher in the samples of *C. canadensis* resistant (R), but the effective number of alleles and the values of H_o and H_e , were equivalent in sensitive genotypes (S) and resistant, indicating that *C. canadensis*-S and *C. canadensis*-R has the same potential to colonize new areas. The values of H_o and H_e were also similar among the genotypes of *C. sumatrensis*-S and *C. sumatrensis*-R. Samples of *C. sumatrensis* formed genetically structured populations ($F_{ST} = 0.4822$). In the municipalities of Campo Mourão and Cafelândia copies of *Conyza* features at the molecular level, for microsatellite loci *C. canadensis*, *C. bonariensis* and *C. sumatrensis*, and copies that share alleles characteristic of the species, indicating the occurrence of the three species, suggesting that there is an exchange of alleles between the three *Conyza* species in that region.

Keywords: Microsatellite, resistance, genetic diversity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características morfológicas de <i>C. bonariensis</i> , <i>C. canadensis</i> e <i>C. sumatrensis</i>	11
Tabela 2. Municípios e coordenadas geográficas das coletas realizadas de plantas de <i>Conyza sumatrensis</i> no estado do Paraná.....	18
Tabela 3. Reagentes utilizados para o preparo do tampão de extração de DNA das plantas de <i>C. sumatrensis</i> descrita por Doyle e Doyle (1990).....	20
Tabela 4. Localidade da coleta de plantas de <i>Conyza canadensis</i> e <i>Conyza bonariensis</i> no estado da Califórnia, USA.....	21
Tabela 5. Tampão de extração de DNA utilizado para o processo de extração de DNA, segundo a metodologia de Soltis Lab. (2002).....	23
Tabela 6. Reagentes usados para o preparo do tampão CTAB estoque para extração de DNA descrito por Doyle e Doyle (1987), Cullings (1992), segundo a metodologia de Soltis Lab. (2002).....	23
Tabela 7. Relação de <i>primers</i> microssatélites e suas concentrações usadas na reação de amplificação de amostras de DNA das espécies de <i>C. canadensis</i> , <i>C. bonariensis</i> e <i>C. sumatrensis</i>	25
Tabela 8. Número de alelos observados nos 12 locos microssatélites analisados nas três espécies de <i>Conyza</i> (<i>C. canadensis</i> , <i>C. bonariensis</i> , e <i>C. sumatrensis</i>).....	31
Tabela 09. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de plantas das três espécies de <i>Conyza</i> (<i>C. canadensis</i> , <i>C. bonariensis</i> , e <i>C. sumatrensis</i>).....	31
Tabela 10. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), dos coeficientes de fixação F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965) e o valor do fluxo gênico (Nm) para plantas das três espécies de <i>Conyza</i> : <i>C. canadensis</i> , <i>C. bonariensis</i> e <i>C. sumatrensis</i>	33
Tabela 11. Valores de identidade genética (I) entre as plantas das três espécies de <i>Conyza</i> (<i>C. canadensis</i> , <i>C. bonariensis</i> e <i>C. sumatrensis</i>).....	34
Tabela 12. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de plantas de <i>C. canadensis</i> resistentes (R), susceptíveis (S) e <i>C. bonariensis</i> resistentes (R) e com resistência múltipla ($2R$).....	37
Tabela 13. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) dos coeficientes de fixação	

F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965) e o valor do fluxo gênico (Nm) nas amostras de plantas de <i>Conyza canadensis</i> resistentes (R), susceptíveis (S) e <i>C. bonariensis</i> resistentes (R) e com resistência múltipla ($2R$).....	38
Tabela 14. Valores de identidade genética (I) entre as plantas das <i>Conyza canadensis</i> resistentes (R), susceptíveis (S) e <i>C. bonariensis</i> resistentes (R) e com resistência múltipla ($2R$).....	39
Tabela 15. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de plantas de <i>Conyza sumatrensis</i> (R e S) distribuídas em locais diferentes no estado do Paraná (PR).....	40
Tabela 16. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) dos coeficientes de fixação F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965) e o valor do fluxo gênico (Nm) nas amostras de plantas de <i>Conyza sumatrensis</i> (R e S) distribuídas em locais diferentes no estado do Paraná (PR).....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Etiqueta branca: plântula de *C. canadensis* e etiqueta laranja: plântula de *C. bonariensis*.....12
- Figura 2 Gel de agarose a 0,8% preparado com tampão TAE com concentração 1X pH 8,0 (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) utilizado para avaliar e quantificar as amostras de DNA. As amostras 1, 2 e 3 são de DNA de fago λ com as concentrações de 50, 100 e 150 ng, respectivamente. As amostras de 4 a 22 são DNAs extraídos de *Conyza sumatrensis*.....27
- Figura 3 Gel de agarose 1% preparado com tampão TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 mmol/L EDTA) utilizado para avaliar e quantificar as amostras de DNA. As amostras de 1 a 4 são de *Conyza canadensis*, e 6 a 11 são amostras de *Conyza bonariensis*.....28
- Figura 4 Gel de agarose a 2% utilizado para separar os fragmentos de DNA de *C. sumatrensis* com primer HW14. Amostras 1 ao 4 Campo Mourão, 5 a 8 Floresta, 9 ao 11 Floresta, 12 ao 15 Cascavel, 16 ao 20 Campo Mourão, 21 ao 25 Cafelândia, 26 ao 29 Cafelândia, 30 ao 33 Peabiru, 34 ao 38 Toledo e 39 ao 43 Cascavel.....29
- Figura 5 Gel de agarose a 2% utilizado para separar os fragmentos de DNA de *C. canadensis*. Amostras 1 ao 9 plantas de *C. canadensis* resistentes coletado em Dinuba, CA, amostras 10 ao 18 *C. canadensis* coletado em Fresno, CA, amostras 19 ao 41 plantas de *C. bonariensis* resistente coletado em Parlier, CA, amostras 42 ao 45 *C. bonariensis* resistência múltipla, coletado em Parlier, CA.....30
- Figura 6 Gráfico *bar plot* obtido de acordo com modelo baseado no algoritmo Baysiano, a partir da análise de locos microssatélites das amostras de plantas de *C. canadensis* (1-2), *C. bonariensis* (3-4) e *C. sumatrensis* (5-14). Cada planta está representada por uma barra vertical uniforme, ou dividida em K segmentos coloridos (K = 3), com tamanhos proporcionais para cada grupo K de alelos, inferido na análise. Cada cor (verde, azul e vermelho) representa a proporção de alelos de cada grupo, ilustrado na barra vertical. Amostra (1): *C. canadensis*-S; (2): *C. canadensis*-R; (3): *C. bonariensis*-R; (4): *C. bonariensis*-2R; (5-14): *C. sumatrensis*: Campo Mourão¹-S (5); Floresta¹-S (6); Floresta²-S (7); Cascavel¹-R (8); Campo Mourão²-S (9);

Cafelândia¹-S (10); Cafelândia²-S (11); Peabiru-S (12); Toledo-R (13); Cascavel²-S/R
(14).....36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Plantas daninhas.....	3
2.2	Família Asteracea.....	5
2.2.1	O Gênero <i>Conyza</i>	6
2.2.2	<i>Conyza canadensis</i>	6
2.2.3	<i>Conyza bonariensis</i>	8
2.2.4	<i>Conyza sumatrensis</i>	9
2.3	Diferença morfológica entre as espécies.....	10
2.4	Interferências das plantas daninhas nas culturas.....	13
2.5	Resistência e diversidade genética.....	14
2.6	Marcadores moleculares.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	Coleta de sementes e semeadura de <i>C. sumatrensis</i>	18
3.2	Extração do DNA <i>C. sumatrensis</i>	19
3.2.1	Avaliação e quantificação dos DNAs extraídos de <i>C. sumatrensis</i>	21
3.2.2	Coleta de sementes e semeadura de <i>C. canadensis</i> e <i>C. bonariensis</i>	21
3.2.3	Extração DNA <i>C. canadensis</i> e <i>C. bonariensis</i>	22
3.2.4	Avaliação da qualidade do DNA extraído de <i>C. canadensis</i> e <i>C. bonariensis</i>	24
3.2.5	Análise dos locos microssatélites via PCR.....	24
3.2.6	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	Análise do DNA e da diversidade genética entre as plantas das três espécies de <i>Conyza</i> (<i>C. canadensis</i> , <i>C. bonariensis</i> e <i>C. sumatrensis</i>).....	27
4.2	Diversidade genética entre as plantas de <i>C. canadensis</i> resistentes (R), susceptíveis (S) e <i>C. bonariensis</i> resistentes (R) e com resistência múltipla (2R).....	37
4.3	Diversidade genética entre as plantas de <i>Conyza sumatrensis</i> (R e S) distribuídas em locais diferentes no estado do Paraná.....	39
5	CONCLUSÕES.....	44
6	REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

As plantas daninhas agrícolas, selecionadas pela manutenção das culturas feitas pelo homem, são hoje um fenômeno ecológico e evolutivo relativamente recente (NEVE et al., 2009). Algumas espécies invasoras podem causar perdas econômicas graves na agricultura e silvicultura (WILCOVE et al., 1998; PIMENTEL et al., 2000; SAKAI et al., 2001; BOSSDORF et al., 2005). No entanto, as plantas daninhas também fornecem oportunidades significativas para estudar consequências genéticas de populações com faixa de expansão (SAKAI et al., 2001; HASSEL et al., 2005). Geralmente, a colonização de novas áreas envolve efeitos fundadores consideráveis com a deriva genética, que reduz a variação genética e pode aumentar a diferenciação genética entre as populações (HUSBAND e BARRETT, 1991; NOVAK e WELFLEY, 1997; AMSELLEM et al., 2000).

Oerke (2006) considera que a porcentagem de perda de rendimento das culturas atribuível às plantas daninhas pouco mudou desde a década de 1960, sugerindo que as empresas de defensivos agrícolas, agricultores e pesquisadores, que trabalham com plantas daninhas, estão em uma "corrida armamentista de plantas daninhas" na procura por estratégias de controle, enquanto a seleção artificial atua para o controle sobre os genomas, selecionando os genótipos resistentes.

Os mecanismos e fatores envolvidos com a resistência ao glifosato em espécies de plantas daninhas do gênero *Conyza*, por exemplo, têm sido amplamente investigados desde a última década do século passado (VIDAL e FLECK, 1997). As evidências e a seleção de biótipos resistentes das espécies *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* também têm sido estudadas por diversos investigadores (MOREIRA et al., 2006; VARGAS et al., 2007; LAMEGO e VIDAL, 2008; SANTOS, 2012).

Uma das espécies mais distribuídas no mundo é a *C. canadensis*, sendo encontrada, principalmente, em regiões de clima temperado do hemisfério Norte, ou clima subtropical do hemisfério Sul, enquanto a espécie *C. bonariensis* é nativa da América do Sul, ocorrendo de forma abundante na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste), e também na Colômbia e Venezuela onde infesta a cultura de café (KISSMANN e GROTH, 1999). A *C. sumatrensis* está descrita como uma espécie que parece ter origem nas Américas e que se espalhou por regiões mais quentes de todos os continentes (THEBAUD e ABBOTT, 1995).

As chaves para a identificação de espécies de *Conyza* definem bem as características de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* (WURZELL, 1988; PRUSKI e SANCHO, 2006), entretanto, existem dificuldades para a identificação segura e a distinção entre as três espécies, devido às semelhanças entre elas, à variabilidade morfológica dentro de cada espécie, à descrição de variedades dentro de algumas espécies, e à descrição de hibridização entre espécies diferentes (THEBAUD e ABBOTT, 1995). Frequentemente, *C. sumatrensis* é confundida e identificada como *C. bonariensis* e, também, como *C. canadensis*.

Diversos fatores de resistência têm sido verificados indicando que há também variabilidade entre os biótipos resistentes (GONZÁLEZ-TORRALVA et al., 2010; ZHENG et al., 2011). Entretanto, pouca atenção tem sido dispensada ao estudo de como as populações de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* estão geneticamente estruturadas; a diversidade genética em nível molecular nestas espécies é desconhecida. Conhecer a diversidade genética e a forma como estas espécies estão geneticamente estruturadas é um aspecto importante para identificar as unidades de manejo e organizar planos efetivos para o controle destas. Biótipos com uma ampla variabilidade genética devem responder de forma diferente às aplicações de um mesmo tipo ou de uma mesma dose de herbicidas, e isto é um fator que pode contribuir para a evolução de resistência a herbicidas.

A proposta no presente estudo foi investigar a variabilidade genética em nível molecular, e verificar a forma como estão geneticamente estruturadas as espécies *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*, analisando o polimorfismo em locos de sequências simples repetidas (locos SSR) de DNA, também denominados locos de microssatélites. As técnicas moleculares de análise permitem estimar a variabilidade genética dentro e entre espécies, além de servirem como ponto de partida para estudos de manejo de plantas daninhas. Com a análise da diversidade genética em nível molecular, será possível indicar locais com maior ou menor divergência genética, e também pode ser útil para revelar marcadores moleculares específicos (alelos) exclusivos de uma ou outra espécie de *Conyza*, contribuindo, assim, para subsidiar a identificação e a distinção entre as três espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas daninhas

Desde o início da agricultura e da pecuária, as plantas que infestavam espontaneamente as áreas de ocupação humana e que não proporcionavam alimentos, fibras ou forragem eram consideradas indesejáveis e foram rotuladas de plantas daninhas (GALLI e MONTEZUMA, 2005). De acordo com Silva et al. (2006), definir planta daninha nem sempre é fácil, devido à evolução e complexidade que, atualmente, atingiu a Ciência das Plantas Daninhas. Entretanto, todos os conceitos baseiam-se na sua indesejabilidade em relação a uma atividade humana. Uma planta pode ser daninha em determinado momento se estiver interferindo negativamente nos objetivos do homem, porém esta mesma planta pode ser útil em outra situação ou cenário biológico (SILVA et al., 2006).

Por esse motivo, são vários os conceitos sobre plantas daninhas. Shaw (1956), que as enquadra como "toda e qualquer planta que ocorre onde não é desejada". Um conceito mais voltado às atividades agropecuárias é exaltado na definição proposta por Blanco (1972), que define como planta daninha "toda e qualquer planta que germine espontaneamente em áreas de interesse humano e que, de alguma forma, interfira prejudicialmente nas atividades agropecuárias do homem".

Portanto, o conceito de planta daninha envolve qualquer espécie: herbácea, arbustiva, arbórea, aquática, terrestre, parasítica, epífita, melhorada, silvestre, rural, urbana. Com o desenvolvimento da sociedade humana, ocorreu não só a continuidade como a expansão geográfica das áreas de agricultura e pecuária, o que permitiu a evolução das plantas pioneiras e o aparecimento de novas espécies. Assim, as comunidades infestantes foram se tornando cada vez mais densas, diversificadas e especializadas na ocupação dos agroecossistemas, passando a interferir profundamente nas atividades agrícolas. Esse tipo de vegetação passou a ser alvo de controle (SILVA et al., 2006).

De acordo com Galli e Montezuma (2005), no início a atividade de controle restringia-se a capina das plantas daninhas que se destacavam em termos de porte. Esse tipo de manejo promoveu uma seleção antropogênica das plantas de pequeno porte ou de hábito mais prostrado. A queima dos restos culturais logo após a colheita representava outra prática agrícola com grande impacto de controle das plantas daninhas e que promovia uma ação de seleção para plantas de ciclo mais curto, com rápida produção de propágulos, afetava a biodiversidade local com intensa mortalidade de insetos e outros animais.

Para um leigo, o controle de plantas daninhas, usando métodos manuais, mecânicos ou químicos, é extremamente simples. Entretanto, Silva et al. (2006) salientam que, na verdade, o estudo das plantas daninhas é uma ciência multidisciplinar que depende de conhecimentos de botânica, biologia, mecanização agrícola, física e química do solo, química orgânica, bioquímica, fisiologia vegetal, climatologia, fitotecnia, técnicas de biologia molecular e sensoriamento remoto. Estes mesmos autores ressaltaram também que, como toda ciência, o estudo das plantas daninhas é dinâmico. Novas técnicas estão sempre sendo pesquisadas e incorporadas, técnicas de biologia molecular (biotecnologia) e o sensoriamento remoto tem sido úteis na identificação de plantas daninhas.

Galli e Montezuma (2005) salientam que com o desenvolvimento dos primeiros equipamentos agrícolas, a capina manual passou a predominar nos campos agrícolas, favorecendo a seleção de plantas com propagação vegetativa e com habilidade de rebrota precoce. Esse tipo de seleção foi incrementado com a utilização da tração animal, que permitiu a intensificação da mobilização do solo como uma das formas de eliminação das plantas daninhas. O plantio em linhas foi uma prática que, se por um lado facilitou a utilização do cultivo manual, por outro aumentou a disponibilidade de nichos adequados à instalação e ao desenvolvimento das plantas daninhas.

De acordo com os autores acima referenciados (GALLI e MONTEZUMA, 2005), toda e qualquer técnica de manejo de plantas daninhas somente terá sucesso se for aplicada levando-se em conta conhecimentos detalhados da biologia das plantas infestantes da área, envolvendo, principalmente, conhecimentos nas áreas de morfologia e fisiologia. Na primeira metade do século 20, a mecanização agrícola foi a grande arma para o controle das plantas daninhas, devido à força e à diversidade dos equipamentos de preparo do solo, os quais eram eficientes nas mais diversas situações da agricultura mundial.

Na segunda metade do século 20, houve aumento expressivo do controle químico com o desenvolvimento da indústria de herbicidas. Nesse período, grande número de produtos de diferentes classes químicas e modos de ação foram liberados no mercado (SOUZA, 2009). Alguns autores argumentam que devido à grande diversidade dos modos e mecanismos de ação dos herbicidas, não houve uma pressão de seleção específica de uma ou outra característica da vegetação. Segundo Silva et al. (2006), com a dificuldade de se encontrar mão de obra no campo, no momento preciso e na quantidade necessária, além da eficiência e, principalmente, economicidade do controle químico, o uso de herbicidas tornou-se uma

prática indispensável, sendo necessários, entretanto, cuidados técnicos para atingir a máxima eficiência com o mínimo impacto negativo ao solo, à água e aos organismos não-alvos.

2.2. Família Asteraceae

O gênero *Conyza* é uma espécie de planta daninha pertencente à família *Asteraceae*, sendo a família botânica com o maior número de espécies entre as *Magnoliophytas*, e também conhecida por *Compositae* ou compostas. São, aproximadamente, 50.000 espécies divididas em 900 gêneros (WATSON e DALLWITZ, 1992).

A família *Asteraceae* é constituída de ervas perene, subarbustos e arbustos, mas ocorrem também ervas anuais, lianas e árvores (MONDIN, 2006). Devido ao seu extraordinário poder de adaptação ambiental, as plantas da família *Asteraceae* podem ser encontradas nos mais diversos habitats e em variadas condições climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais até temperadas. Um dos fatores importantes para seu sucesso biológico deve-se a sua grande capacidade de dispersão devido à presença de sementes com pápus plumosos, apêndices, estruturas de aderência, e ao seu potencial de síntese de metabólitos secundários específicos (VENABLE e LEVIN, 1983).

De acordo com Andenberg et al. (2007), *Asteraceae* é uma das maiores famílias de plantas e compreende cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies. No Brasil, a família é representada por, aproximadamente, 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetais (BARROSO et al., 1991; NAKAJIMA e SEMIR, 2001). As plantas da família *Asteraceae* apresentam distribuição cosmopolita, encontrando-se disseminadas por todos os continentes, com exceção da Antártica, porém com representação mais ampla nas regiões temperadas e semi-áridas dos trópicos e subtropicais.

Roque e Bautista (2008) descreveram as seguintes características para plantas da família *Asteraceae*: caule geralmente cilíndrico, raramente alado; folhas em roseta, alternas, opostas, alterno-opostas, ou menos comumente verticiladas, simples, frequentemente lobadas ou pinatissectas, raramente compostas, estípulas ausentes; inflorescência em capítulo; capítulos solitários no ápice do pedúnculo floral ou formando inflorescência cimoso, corimbiforme, panícula-tirsóide, racemo, ou ainda agrupados em inflorescência de segunda ou terceira ordem, livres ou fundidos entre si (sincefalia de capítulos); capítulo formado de flores sésseis, 1-500 ou mais por capítulo, maturação indeterminada, circundado por um involúcro de brácteas, cilíndrico, hemisférico ou globoso; brácteas involucrais (1)2-muitas séries, persistentes, raro decíduas, imbricadas a eximbricadas; eixo da inflorescência plano, convexo

ou cônico, paleáceo, ciliado, escamiforme, piloso ou glabro e, então, liso, areolado com aréolas poligonais ou alveolado, com depressões nas quais as flores são inseridas; capítulos homogamos (flores com arranjos sexuais iguais), do tipo discóide (contém um único tipo de flor), e capítulos heterógamos (flores com arranjos sexuais distintos), do tipo radiado (flores do raio e do disco) e disciforme (dois tipos distintos de flores actinomorfas); flores bissexuais, unissexuais (plantas monóicas, raramente dióicas), estéreis (androceu e gineceu estéreis) ou neutras (sem androceu e gineceu); cálice ausente ou modificado em *papus*.

2.2.1. O Gênero *Conyza*

O gênero *Conyza* é representado por aproximadamente 100 espécies, contendo plantas herbáceas anuais e bianuais, que habitam, principalmente, regiões tropicais e subtropicais e se desenvolvem no inverno e verão (LORENZI, 2000). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo são: *Conyza bonariensis*, *Conyza sumatrensis* e *Conyza canadensis*, sendo as duas primeiras originárias da América do Sul e a terceira originária da América do Norte.

2.2.2. *Conyza canadensis*

Conyza canadensis (L.) Cronquist é nativa da América do Norte (NOYES, 2000); sendo uma das espécies mais amplamente distribuídas no mundo, esta espécie está presente em quase todas as regiões do Canadá (ROULEAU e LAMOUREUX, 1992), Estados Unidos (USDA, 1970), oeste da Europa e Planície Mediterrânea (THEBAUD e ABBOTT, 1995), Austrália e Japão (HOLM et al., 1997). A *C. canadensis* possui ciclo anual, ocorrendo no inverno e no verão, infestando mais de 40 tipos de culturas diferentes; são encontradas em pomares, vinhedos, campos agrícolas, pastagens, estradas e margens de canais (WEAVER, 2001).

A *C. canadensis* é uma espécie autógama, com estimativas que variam de 85-99% de autofecundação em ambientes naturais, dependendo da altura da planta e proximidade com a planta vizinha, e se reproduz apenas por sementes (WEAVER, 2001). *C. canadensis* é uma espécie diplóide, com um número cromossômico de $2n = 18$ (MULLIGAN, 1957; FEDEROV, 1969; THEBAUD e ABBOTT, 1995), cada planta é capaz de produzir mais de 200.000 sementes que podem se dispersar pelo vento ou pela água (DAVIS et al., 2009), sendo que sua dispersão pode atingir de 100 a 500 metros da planta de origem, segundo Dauer et al., (2007).

A maturação das sementes de *C. canadensis* ocorre três semanas após a fertilização. O peso médio da semente (sem o *papus*) é 0,072 mg, sendo 15% representado pela casca e 85% pelo embrião (FENNER, 1983). O número médio de sementes por capítulo em *C. canadensis* varia de 60 a 70 (SMISEK, 1995; THEBAUD e ABBOUT, 1995).

As sementes maduras de *C. canadensis* não são dormentes e podem germinar sempre que as condições de temperatura e umidade do ambiente forem favoráveis (WU e WALKER, 2006). Steinmaus et al. (2000) verificaram que a temperatura mínima para germinação de sementes de *C. canadensis* foi estimada em 13 °C. Alguns autores relataram que a luz pode ser (ROLLIN e TAN, 2004) ou não (GORSKI, 1975) necessária para desencadear a germinação destas sementes.

A emergência de *C. canadensis* diminuiu em 90% a partir de sementes que foram enterradas numa profundidade de 1 cm abaixo da superfície do solo, comparadas a sementes posicionadas na superfície do solo (TREMMELE e PETERSON, 1983). Resultado similar foi obtido em estudos realizados por Nandula et al. (2006), que verificaram a não emergência a partir de sementes enterradas à profundidade maior que 0,5 cm. Por outro lado, Bhowmik e Bekech (1993) realizaram um estudo nos USA o qual mostrou que nenhuma semente de *C. canadensis* germinou em profundidade acima de 6 cm de profundidade.

Bhowmik e Bekech (1993) argumentaram que para que ocorra a germinação das sementes de *Conyza*, estas necessitam de luz e pode-se impedir este processo utilizando altos níveis de palha de culturas de cobertura juntamente à superfície do solo. Usando este processo, além de impedir, atrasa a germinação, dando tempo para que a cultura instalada se estabeleça e suprima a população tardia de plantas daninhas que, eventualmente, venha a emergir.

Bhowmik e Bekech (1993) mostraram que a presença de resíduos de culturas de cobertura (6 t ha⁻¹) atrasou a germinação de sementes de *C. canadensis* em quatro semanas e reduziu a emergência total de plântulas em 80%. *C. canadensis* foi descrita como sendo encontrada em solos pobres e bem drenados (FRANKTON e MULLIGAN, 1987).

De acordo com Nandula et al. (2006), as sementes desta espécie germinam sob condições de alta salinidade do solo e a germinação ocorre em maior nível em solos de pH neutro para alcalino, comparativamente aos solos ácidos. Embora ocasionalmente as plantas de *C. canadensis* colonizem várzeas, elas são intolerantes à inundação (STOECKER et al., 1995; SMITH e MOSS, 1998). Elas também ocorrem em solos orgânicos (LEROUX et al., 1996), em cascalhos, na beira de precipício e bancos rochosos.

Quando as inflorescências são emitidas na primavera, as plantas florescem no início do verão e o pico da produção de sementes ocorre de meados ao final do verão (WEAVER, 2001). No que se referem à longevidade das sementes de *Conyza*, estas são capazes de sobreviver entre 2 e 3 anos, devido a semente apresentar um porte pequeno e não ter capacidade de reserva nutritiva para longos períodos.

Segundo VanGessel (2001), a primeira espécie com a resistência ao glifosato foi *C. canadensis*, em sistemas de cultivo de soja em Delaware (USA). Atualmente, considera-se que *C. canadensis* está entre as dez mais importantes plantas daninhas resistentes a herbicidas, já esta espécie desenvolveu resistência aos mecanismos de ação dos herbicidas inibidores fotossistema II, ureias, amidos, inibidores de ALS e glifosato (POWLES e YU, 2010; HEAP, 2012). Para a espécie *C. canadensis* tem 26 relatos de resistência ao glifosato sendo 22 nos USA, e os demais na China, Espanha e República Checa (HEAP, 2012).

Para a espécie de *C. canadensis*, tem descrições de que pode ser usada como uma planta medicinal na medicina popular (HOLM et al., 1997). O óleo destilado das folhas foi vendido como um diurético, tônico, adstringente (TEHON, 1951). O óleo contém 47 componentes voláteis, dos quais 91% são terpenóides (MIYAZAWA et al., 1992). Os extratos aquosos das folhas foram indicados como um agente anti-hipertensor (LASSERRE et al., 1983). A planta contém uma grande variedade de flavonoides e taninos, além dos óleos essenciais (STRZELECKA e GLINKOWSKA, 1981; CZECHOT et al., 1990), mas o seu papel nas propriedades medicinais da planta não é clara.

Plantas de *C. canadensis* são relativamente abundantes e a altura da inflorescência dos indivíduos decresce notadamente nos dois anos que seguem seu aparecimento. Tremmel e Peterson (1983) atribuíram tal declínio à competição exercida por outras espécies da sucessão. Foi referido haver atividade alelopática de *C. canadensis*, a qual foi atribuída à presença de poliacetilenos, exsudados, principalmente, pelas raízes (WEAVER, 2001).

2.2.3. *Conyza bonariensis*

A espécie *C. bonariensis* é nativa da América do Sul e ocorre de forma abundante na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil. No Brasil, sua presença é mais intensa nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Ela também está presente na Colômbia e na Venezuela, onde infesta lavoura de café (KISSMANN e GROTH, 1999).

Assim como *C. canadensis*, a espécie *C. bonariensis* se destaca por infestar áreas abandonadas como terrenos baldios e margens de estradas, pastagens, culturas perenes, citros,

café e lavouras anuais de algodão, milho, soja e trigo (THEBAUD e ABBOTT, 1995), e foram descritas como um grande problema em áreas urbanas; em termos mundiais, os relatos são de que esta espécie daninha infesta mais de 40 culturas (HOLM et al., 1997).

A espécie *C. bonariensis* foi descrita como sendo hexaplóide, com o número de cromossomos $2n = 54$ (GOLDBLATT, 1985); o número médio de sementes por capítulo situando-se entre 190 e 550 sementes, com média de 400 sementes por capítulo (WU e WALKER, 2006) e a sua propagação ocorrendo somente via semente.

Para a germinação de sementes de *C. bonariensis*, em um estudo realizado por Rollin e Tan (2006), na Austrália, estes autores constaram que a ótima temperatura é 20 °C. Isso explica a emergência de plântulas no início do outono e no início da primavera, quando as temperaturas se aproximam de 20 °C. No entanto, as temperaturas mínima e máxima para germinação de *C. bonariensis* foram estimadas em 4,2 °C e 35 °C, respectivamente (ROLLIN e TAN, 2006).

Na Austrália, um estudo indicou que sementes de *C. bonariensis* emergiram somente na faixa de 1-2 cm abaixo da superfície do solo e que sua viabilidade foi curta (WALKER et al., 2006). Entretanto, sob condições de laboratório, a maioria das sementes de *C. bonariensis* emergiu numa profundidade de 0,5 cm, um pequeno número a 1 cm e nenhuma semente a 2 cm (ROLLIN e TAN, 2006).

Segundo Kissmann e Groth (1999), o ciclo de *C. bonariensis* se completa na primavera ou no verão. Na Austrália constatou que as plantas podem emergir durante todo o ano, mas o pico de emergência ocorre durante a primavera (WALKER et al., 2006). Em relação ao porte da planta, esta foi descrita como apresentando entre 40 e 60 cm, tendo ramificação no caule onde os ramos laterais ultrapassam o caule central.

Heap (2011) relatou que *C. bonariensis* apresenta biótipos com resistência a quatro mecanismos de ação diferentes: inibidores do fotossistema I e II, inibidores da enzima ALS e inibidores da EPSPS. No Brasil, foram identificados biótipos de *C. bonariensis* resistentes ao glifosato (VARGAS et al., 2007).

2.2.4. *Conyza sumatrensis*

Thebaud e Abbott (1995) descrevem a espécie *C. sumatrensis* como nativa da América do Sul e que se espalhou para as regiões mais quentes de todos os continentes. Esta espécie foi caracterizada por alguns investigadores como sendo uma planta herbácea apresentando um ciclo anual ou bianual (THEBAUD et al., 1996; CASE e CRAWLEY,

2000). Goldblatt (1985) descreveu a espécie *C. sumatrensis* como sendo hexaploide, com o número de cromossomos $2n=54$.

Case e Crawley (2000) e Hao et al. (2009) relataram que as plantas de *C. sumatrensis* se reproduzem apenas por sementes, principalmente de auto-polinização, e que esta espécie torna-se invasiva em muitas zonas subtropicais e temperadas (THEBAUD et al., 1996; CASE e CRAWLEY, 2000; DING et al., 2008). Na literatura especializada, as informações a respeito desta espécie são escassas, principalmente, com relação a sua biologia.

2.3. Diferenças morfológicas entre as espécies de *Conyza*

Atualmente, no Brasil, já foram identificadas e catalogadas algumas espécies, como *Conyza blakei*, *Conyza floribunda* e *Conyza primulifolia* (Lam.), no Rio Grande do Sul (CANCELLI et al., 2005) e *Conyza monorchis*, em Minas Gerais (BORGES e FORZZA, 2008). Segundo Thebaud e Abbott (1995), a espécie considerada como a mais difundida em todo o mundo é *C. canadensis*. Isso se deve a algumas características reprodutivas associadas ao alto potencial invasivo dessa espécie, entre as quais a grande produção de sementes, germinação rápida e a alta capacidade de dispersão dos aquênios (HAO et al., 2009).

Várias características morfológicas para *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis* estão descritas na literatura especializada (URDAMPILLETA et al., 2005; PRUSKI e SANCHO, 2006; VLADIMIROV, 2009; SANTOS, 2012). Atualmente, é possível que algumas vezes possa ocorrer a identificação equivocada das espécies de *Conyza* presentes no campo, em razão da semelhança entre as espécies, principalmente em relação a *C. canadensis* e *C. sumatrensis*, entretanto, as várias características morfológicas podem auxiliar na identificação (Tabela 1).

Tabela 1. Características morfológicas de *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis*

Características	Espécie		
	<i>C. bonariensis</i>	<i>C. canadensis</i>	<i>C. sumatrensis</i>
Origem	América do Sul	América do Norte	América do Sul
Sinônimos	<i>Erigon bonariensis</i>	<i>Erigon canadensis</i>	<i>C. albida</i>
Altura do caule	40-60 cm	100-150 (180) cm	100-150 (200) cm
Ramificação do caule	Ramos laterais passam do ramo terminal	Ramos laterais não ou raramente passam do ramo terminal	Ramos Laterais não passam do ramo terminal
Inflorescência	Paniculas encontram-se na parte superior do caule e ramos	Amplamente colunar, podendo ser ereta ou ± piramidal a losangular	Com forma claramente de losango
Tamanho da Flor	Diâmetro \geq 10 mm	Diâmetro < 10 mm	Diâmetro < 10 mm
Pelos da haste	Elevada densidade de pelos	Pouco a moderado	Densamente peludo
Plumagem da margem Da folha	Com elevada densidade de pelos finos e longos	Coberto de pelos duros e espessos	Densa, pelos finos e longos dispersos por toda a margem
Diâmetro e pelos das brácteas	5-8 mm; densamente peluda	2-4 mm; glabra (sem pelos) ou quase isso	5-7 mm; densamente peluda
Cor da margem apical das brácteas	Geralmente avermelhada	Verde	Verde
Cor do pappus	Branco	Castanho claro	Castanho claro
Cor da Flor	Branca	Castanho claro	Castanho claro

Fonte: Urdampilleta et al. (2005); Pruski e Sancho (2006); Vladimirov (2009); Santos (2012).

A espécie *C. sumatrensis* pode ser facilmente confundida com *C. canadensis* por apresentar inflorescências semelhantes, em forma piramidal a losangular. A principal diferença morfológica entre as duas espécies está na densidade de pelos nas brácteas e folhas.

A *C. canadensis* é distinguida por não apresentar pelos ou brácteas quase glabras (sem pelos), enquanto *C. sumatrensis* é densamente peluda (Santos, 2012). *C. canadensis* e *C. bonariensis* (Figura 1) podem ser facilmente diferenciadas pelo formato de suas folhas, *C. bonariensis* tem folhas finas e estreitas e *C. canadensis* apresenta folhas com bordas serrilhadas.



Figura 1. Etiqueta branca plântulas de *C. canadensis* e etiquetas laranja plântula de *C. bonariensis*. (Fonte: MAROCHIO, C.A.).

Santos (2012) descreveu que as espécies *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* podem ser facilmente diferenciadas pela inserção da flor, altura da planta, tamanho e cor da flor. A *C. bonariensis* apresenta inflorescência menor, na forma de panículas, mais amplas na parte superior do caule e dos ramos de cada haste se eleva uma panícula pequena para um nível maior, produzindo uma inflorescência ramificada, com diâmetro maior que 10 mm e coloração branca. *C. sumatrensis* possui inflorescência na forma piramidal ou, às vezes, losangular, a inflorescência é menor, com diâmetro menor que 10 mm e coloração castanho claro.

2.4. Interferências das plantas daninhas nas culturas

Wicks et al. (1994) e Buhler (1995) descreveram as espécies de plantas daninhas como sendo um problema nos campos de produção agrícola, e que têm um grande aumento após o preparo para a nova safra. As plantas daninhas anuais de inverno surgem no final do verão ou outono, sobrevivem ao inverno, e produzem sementes para a próxima primavera e verão.

Lorenzi (2000) registrou que as plantas daninhas podem competir diretamente com as culturas por água, luz, CO₂ e nutrientes, e, indiretamente, mediante liberação de compostos alelopáticos que impedem o desenvolvimento normal das plantas; as plantas podem competir entre si (intra-específica) e com outras plantas (inter-específicas). Além disso, foi também considerado que as plantas daninhas podem promover decréscimo na qualidade do produto colhido, como também provocar dificuldades durante a realização da colheita.

Pitelli (1985) ressaltou que o grau de interferência das plantas daninhas nas culturas depende da comunidade vegetal infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivar, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do período de convivência. De acordo com Ferreira (2000), competição por recursos não deve ser confundida com alelopatia. Para este autor, alelopatia seria qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente.

Shrestha et al. (2008) descreveram que *C. canadensis* e *C. bonariensis* podem competir diretamente com videiras por nutrientes, água e luz, podem reduzir o vigor dessas plantas especialmente em campos onde as plantas são jovens. A *C. bonariensis* pode ser um grande problema em vinhedos. Em pomares de nozes na Califórnia, USA, por exemplo, a forte concorrência com essas plantas daninhas pode reduzir a altura dessas árvores no primeiro ano em até 30 cm. De acordo com estes autores (SHRESTHA et al., 2008), se não for realizado o controle adequado, as plantas de *C. bonariensis* crescem mais que o dossel da videira, interferindo na colheita e outras operações de campo.

Na América do Norte, *C. canadensis* foi descrita como uma espécie que infesta pomares, vinhas, culturas como milho, soja e algodão, principalmente onde o sistema de plantio direto é usado, e também infesta culturas para a produção de feno e pastagens (KAPUSTA, 1979; BUHLER, 1992; WIESE et al., 1995). Esta espécie também foi descrita como uma planta daninha comum nos campos de produção de cenoura e cebola nos solos

orgânicos no Sudeste de Quebec, especialmente pelo fato da ausência da rotação de culturas (LEROUX et al., 1996).

2.5. Resistência e diversidade genética

Segundo os preceitos básicos da genética de populações e evolutiva, a existência de variabilidade genética em indivíduos de uma população aumenta a chance de alguns para responder diferentemente frente a alterações do meio ambiente, de modo que isto possa garantir a preservação da espécie (ALLENDORF e LUIKART, 2007). Por isso, um dos fatores que deve contribuir para determinar respostas diferentes de plantas daninhas frente à aplicação de herbicidas é a variabilidade genética presente em populações das diferentes espécies. As populações de plantas com maior diversidade genética podem se constituir num obstáculo para o controle, porque as plantas apresentam respostas variáveis e/ou concentrações de diferentes herbicidas.

Entre as características de uma linha de descendência, podem estar a adaptabilidade as condições ambientais, a resistência ou suscetibilidade a condições desfavoráveis. A ocorrência de um evento desfavorável pode eliminar todos os indivíduos mais sensíveis e permitir a sobrevivência dos mais resistentes (KISSMANN, 2003).

Vidal e Winkler (2002) descreveram que os fatores que favorecem a seleção de biótipos resistentes envolvem características relacionadas às plantas daninhas, aos herbicidas e às práticas culturais. Uma das características inerentes às plantas daninhas é a diversidade genética, porque se desenvolvem e evoluem em ambiente hostil. A diversidade genética é comum principalmente entre as plantas daninhas anuais, que são as espécies pioneiras na sucessão ecológica do ambiente agrícola. Segundo Vidal e Merotto Jr. (2001), isso explica, ao menos em parte, porque em nível mundial, a maioria dos biótipos resistentes aos herbicidas é de espécies anuais. A grande diversidade genética favorece a seleção de indivíduos resistentes aos herbicidas devido a maior probabilidade de se encontrar alelo inerentemente insensível ao produto utilizado. Da mesma forma, grandes infestações favorecem o aumento dos riscos de seleção para resistência.

Kissmann (2003) salienta que a sensibilidade natural de espécies de plantas a um herbicida é variável e, por isso, existem herbicidas seletivos para determinadas culturas, mais efetivos para a eliminação de certas espécies de plantas daninhas. Este autor ressalta que convencionou-se designar esses aspectos como tolerância e suscetibilidade, reservando-se o

termo resistência para biótipos resistentes dentro de uma população de biótipos suscetíveis da mesma espécie.

Segundo Yuan et al. (2010), não está claro se é apenas um mecanismo ou vários mecanismos moleculares que são responsáveis por conferir resistência nos biótipos. Um mecanismo denominado de “mecanismo *non target-site*” (não alvo), foi proposto a partir de análise no transporte de glifosato em *Conyza canadensis*. No “mecanismo *non target-site*” a resistência é devido às estrias de caspary, que impede a translocação do herbicida na planta, ou porque há um sequestro do herbicida pelos vacúolos da célula, inativando-o, de modo que a resistência não é decorrente da ligação do herbicida com a enzima 5-enolpiruvoil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSP). Quando ocorre a ligação do herbicida com a enzima EPSP, e esta é inativada impedindo a conversão do shiquimato em coristamo, e o prosseguimento do ciclo de produção de aminoácidos e metabólitos secundários importantes para as plantas (cumarinas, flavonóides, ligninas), o mecanismo de resistência é denominado *target site*. No mecanismo de resistência *target site*, a resistência é devido a uma alteração no “sítio de ação da enzima” que pode ser decorrente de troca de aminoácidos da enzima, em consequência de troca de bases no material genético (YUAN et al., 2007). Desta forma, a alteração que gerou a resistência *target site* na planta, é devido a causas genéticas.

No que se refere aos biótipos resistentes de *Conyza spp.* de diferentes locais, por exemplo, não é conhecido se estes evoluíram de forma independente, ou se estes têm compartilhado o mesmo mecanismo molecular de resistência (STEWART et al., 2009). Jasieniuk et al. (1996) e Neve et al. (2009) postularam que durante a evolução e disseminação de resistência de plantas daninhas a herbicidas, mutações múltiplas conferindo a resistência, a seleção positiva forte, ocorrendo efeito gargalo na população e os eventos fundadores não só determinam a estruturação espacial da variação genotípica de uma paisagem agrícola, mas também devem moldar a variação genética neutra dentro e entre as populações.

2.6. Marcadores moleculares

Os autores Ferreira e Gattapaglia (1995) definem marcador molecular como sendo qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, por exemplo, as isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas, ou não expressas, do genoma. Os marcadores moleculares que apresentam comportamento Mendeliano simples podem, por sua vez, ser empregados como marcadores genéticos, e uma característica importante dos marcadores moleculares é o fato de sua herança não ser influenciada pelo

meio ambiente e deles serem, em geral, neutros. Desta forma, características de DNA, herdadas geneticamente e que servem como base para diferenciar um ou mais indivíduos, são denominadas de marcadores moleculares.

Ainda segundo os mesmos autores (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1995), estes marcadores moleculares incitaram o desenvolvimento de tecnologias que podem revelar variabilidades em nível genômico de uma forma rápida, simples e eficaz. O aprimoramento das técnicas de detecção de polimorfismos no DNA teve um grande avanço após o surgimento da tecnologia do DNA recombinante e a amplificação da molécula de DNA por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), sendo que ambas as técnicas ajudaram a tornar o uso dos marcadores moleculares potencialmente ilimitados.

Os microssatélites, por exemplo, são marcadores moleculares que consistem em motivos de sequências de 1 a 6 pares de bases que se repetem em *tandem*. Estas regiões ocorrem frequentemente e randomicamente nos genomas de plantas e animais e, tipicamente, exibem uma grande variação. De maneira geral, os microssatélites têm sido considerados como os marcadores moleculares mais informativos para estudos de genética em nível de espécies, porque são marcadores codominantes e altamente multialélicos, de alto polimorfismo, apresentando maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1998).

Os microssatélites foram também denominados por Litt e Luty (1989) como sequências simples repetitivas (SSR) em genomas eucariotos. As regiões contendo SSR são amplificadas, individualmente, por meio de PCR, utilizando-se um par de *primers* específico (de 20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. A alta informação contida em loco SSR, aliada à sua expressão codominante, potencial para automação, e também o requerimento de pequena quantidade de DNA, fazem com que as SSRs sejam consideradas marcadores genéticos ideais para mapeamento genético e de alta eficiência para estudos de ligação, proteção de variedades, seleção assistida, estudos de diversidade, entre outros (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Os microssatélites, ou locos SSR, têm sido usados como marcadores moleculares para avaliar polimorfismos de DNA, em estudos com finalidades diferentes, e em diversas espécies de plantas (DEMORE, 2008; CARVALHO, 2007) incluindo espécies de plantas daninhas (GOULART et al., 2011).

Missiaggliá e Grattapaglia (2006) têm salientado que um dos fatores limitantes para o uso dos microssatélites é que o desenvolvimento inicial destes marcadores moleculares

demanda grande quantidade de trabalho e recursos financeiros. Por isso, alternativamente, tem sido recomendado à utilização de *primers* desenvolvidos em determinada espécie, para estudos em espécies similares. Outra limitação para estudos relacionados a marcadores moleculares microssatélites, salientado por Missiaggli e Grattapaglia (2006), é a necessidade de utilização de vários oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), o que contribui para a elevação do custo do estudo a ser realizado.

Na utilização de marcadores microssatélites em plantas daninhas, Goulart et al. (2011) descreveram a técnica da cauda fluorescente como forma de otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites, utilizando, como exemplo, um estudo de identificação de híbridos entre arroz-vermelho e cultivado. Foram utilizadas como modelo plantas de arroz cultivado, arroz-vermelho e o híbrido, originado do cruzamento artificial dessas plantas. A técnica da cauda fluorescente consiste na síntese do iniciador *forward* com a sequência desejada e a adição da sequência de um iniciador universal, que corresponde à chamada cauda. A detecção da amplificação é realizada em equipamento de eletroforese capilar automatizada, através da utilização de um iniciador universal sintetizado com fluoróforo.

Pesquisas feitas com o gênero *Conyza* foram realizadas recentemente por Okada et al. (2013) com a espécie *C. canadensis* para obter informações sobre a evolução, origem e propagação da resistência, investigando a distribuição geográfica da resistência do glifosato em *C. canadensis* no Vale Central da Califórnia, CA, USA, a diversidade genética e a estrutura da população, utilizando os marcadores microssatélites.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de sementes e semeadura de *C. sumatrensis*

As sementes de *C. sumatrensis* foram coletadas nos municípios de Campo Mourão, Floresta, Cascavel, Cafelândia, Peabiru e Toledo no estado do Paraná em Janeiro de 2011. Em alguns municípios foram realizadas duas coletas em pontos diferentes, pois a incidência de plantas nesses locais é elevada. As plantas foram retiradas de áreas com histórico de aplicações de glifosato na dessecação das plantas daninhas e de cultivo de soja RR de no mínimo quatro anos, com observações dos produtores em relação à falta de controle das mesmas após o uso de glifosato.

Cada planta foi colocada individualmente em um saco de papel para não acontecer a mistura de sementes dos diferentes locais de coleta. Os municípios e a localização geográfica das coletas das sementes estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Municípios e coordenadas geográficas das coletas realizadas de plantas de *Conyza sumatrensis* no estado do Paraná.

Município	Número da População	Número de Plantas	Coordenadas Geográficas	Altitude (m)
Campo Mourão	13	4	24°05'54.74" S / 52°20'43.04" W	634
Floresta	18	4	23°33'21.32" S / 52°04'36.93" W	391
Floresta	19	3	23°34'00.63" S / 52°04'57.82" W	383
Cascavel	6	4	24°49'08.94" S / 53°39'26.02" W	625
Campo Mourão	14	5	24°01'26.34" S / 52°19'03.99" W	580
Cafelândia	3	5	24°38'56.38" S / 53°17'50.90" W	593
Cafelândia	2	4	24°36'22.39" S / 53°15'55.23" W	509
Peabiru	17	4	23°53'53.87" S / 52°19'47.31" W	501
Toledo	9	5	24°44'19.22" S / 53°41'42.18" W	531
Cascavel	7	5	24°46'21.33" S / 53°41'01.04" W	547
Total		43		

A semeadura das sementes foi realizada no mês de Maio de 2011 no CTI (Centro de Treinamento de Irrigação) da Universidade Estadual de Maringá – UEM, com a localização

de latitude 23°23'44.91"S e longitude 51°57'3.13"O, elevação de 510 metros na cidade de Maringá, no estado do Paraná.

As sementes foram semeadas em vasos com capacidade de 3 dm³ de solo com posicionamento superficial de aproximadamente 0,5 cm. Após uma semana de semeadura, as sementes já haviam germinado, sendo realizada irrigação diária nas plantas e, quando as plantas atingiram o tamanho de 5 cm de altura, deu-se início ao processo de coleta de folhas e extração de DNA.

Quando as plantas atingiram o florescimento pleno, foi realizado o corte das mesmas para a confecção das unicatas. As unicatas foram enviadas ao Instituto de Biologia – Herbarium Uberlandense, na Universidade Federal de Uberlândia, onde foram catalogadas e classificadas como *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker.

Para se avaliar a resistência, foram realizados testes de resistência em quatro estádios de desenvolvimento, sendo as aplicações realizadas quando as plantas apresentavam-se com cinco a seis folhas verdadeiras, oito a nove folhas, doze a quinze folhas e vinte a vinte três folhas.

3.2. Extração do DNA de *C. sumatrensis*

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal, do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá. Para a extração de DNA das plantas de *C. sumatrensis* foi utilizada a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990). A coleta do material de *C. sumatrensis* ocorreu no mês de Julho de 2011. O DNA foi extraído de folhas jovens. As folhas foram coletadas e acondicionadas em papel alumínio, devidamente identificadas, e acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas para o laboratório. Foram extraídos o DNA de um total de 43 plantas dos 8 municípios selecionados. Para a extração de DNA, as folhas (300 mg) foram pulverizadas em nitrogênio líquido, utilizando um almofariz de porcelana esterilizado e previamente congelado. Após este procedimento, o pó foi transferido para microtubos de 2 mL congelados, devidamente identificados.

Em cada microtubo foram adicionados 800 µL de tampão de extração preparado, seguindo o protocolo apresentado na Tabela 3. Os microtubos foram agitados suavemente em um vortex e incubados em banho-maria em temperatura de 65 °C por 30 minutos. Durante a incubação, os microtubos foram agitados suavemente a cada 10 minutos.

Após este procedimento, os microtubos foram retirados do banho-maria e deixados sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos com 14.000 r.p.m., e a fase aquosa (o sobrenadante) foi transferida para novos microtubos devidamente identificados. A este sobrenadante foi adicionado igual volume (800 µL) de clorofórmio e álcool isoamílico preparado na proporção 24:1.

Estas amostras foram suavemente agitadas por 5 minutos. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos com 14.000 r.p.m. e a fase aquosa (o sobrenadante) foi recuperada e transferida para novos microtubos. Após a purificação do DNA, o precipitado foi transferido para novos tubos e foi adicionado um volume de isopropanol gelado na proporção de 1:1. Os tubos foram vertidos suavemente algumas vezes e foram incubados em -20 °C por um período 3 horas. Após este procedimento, os tubos foram centrifugados por 10 minutos com 14.000 r.p.m. e um precipitado branco formou-se no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado primeiramente com etanol 70% para retirar o sal presente e, posteriormente, com etanol 95%. Em seguida, o precipitado foi deixado à temperatura ambiente para completa secagem.

Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) e incubado em banho-maria com 60 °C por 10 minutos, sendo agitado suavemente para completa solubilização do DNA. Em seguida, para digerir o RNA presente nas amostras, foram adicionados 2 µL de RNase nas amostras que permaneceram por duas horas em temperatura ambiente e, posteriormente, foram acondicionadas no freezer para sua manutenção.

Tabela 3. Reagentes utilizados para o preparo do tampão de extração de DNA das plantas de *Conyza sumatrensis* descrita por Doyle e Doyle (1990).

Estoque	Concentração final	10 mL	20 mL	30 mL	50 mL
NaCl 5M	1,4 M	2,8 mL	5,6 mL	8,4 mL	14 mL
CTAB* 5%	2%	0,2 g	0,4 g	0,6 g	10 g
EDTA 0,5M	20 mM	0,2 mL	0,4 mL	0,6 mL	1 mL
Tris HCl 1M	100 mM	1,0 mL	2,0 mL	3,0 mL	5,0 mL
PVP-40**	2%	0,2 g	0,4 g	0,6 g	1,0 g
β-Mercaptoetanol	0,2%	100 µL	200 µL	300 µL	500 µL
Água Ultrapura	*****	5,9 mL	11,8 mL	17,7 mL	29,5 mL

**Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*.

**PVP 40 – polivinilpirrolidona 40.

3.2.1. Avaliação e quantificação dos DNAs extraídos de *C. sumatrensis*

Para verificar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em concentração de 0,8%, preparado com tampão TAE em concentração 1X pH 8,0 (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) (HOISINGTON et al., 1994), sob voltagem de 80 V. As amostras foram comparadas com DNA do fago λ em concentrações conhecidas de 50, 100 e 150 ng. Para a visualização, o gel foi corado em banho de Brometo de Etídio em concentração 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, o gel foi fotografado sob luz UV, usando um fotodocumentador L-Pix HE (Loccus) utilizando o software L-Pix Image.

As amostras também foram quantificadas em espectrofotômetro UV-visível modelo Picodrop®, para verificar a concentração de DNA por μL de cada amostra para a sua diluição a serem utilizadas nas reações de PCR.

3.2.2. Coleta de sementes e semeadura de *C. canadensis* e *C. bonariensis*

As sementes de *C. canadensis* e *C. bonariensis* foram coletadas em 4 locais diferentes dentro do Vale Central do estado da Califórnia, Estados Unidos (Tabela 4). As sementes de *C. canadensis* resistentes foram coletadas de 9 plantas (HWR) no condado de Madera, na cidade de Dinuba, CA, e de 9 plantas suscetíveis (HWS 156) no condado de Fresno, CA. As sementes de *C. bonariensis* foram coletadas em dois locais diferentes, sendo 4 plantas com resistência múltipla (BH 51) a glifosato e ALS no condado de Fresno na cidade de Parlier, CA, e 23 plantas resistentes a glifosato (BH 53) também em Parlier, CA, totalizando 45 amostras.

Tabela 4. Localidade da coleta de plantas de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* no estado da Califórnia, USA.

Município	Amostras	Número de plantas	Altitude (m)
Dinuba	HWR	9	94
Fresno	HWS 156	9	83
Parlier	BH51	4	103
Parlier	BH53	23	106
Total		45	

**C. canadensis* resistente (HWR), *C. canadensis* susceptível (HWS), *C. bonariensis* (BH).

O experimento foi realizado em casa de vegetação na University of California, Davis, CA. A semeadura das sementes foi realizada no mês de Janeiro de 2013, e as plantas foram cultivadas em casa de vegetação localizada no campo experimental da Universidade, localizado a 38°32'33.52"N 121° 45'47.92"O, com elevação de 17 metros, na cidade de Davis, CA, USA. As plantas foram cultivadas em estufas mantendo as temperaturas em 30/15°C dia/noite, sem iluminação suplementar. Foi utilizado o substrato Sunshine Mix (SunGro Horticulture Canada, Ltda., Vancouver, British Columbia, Canada) para o estabelecimento e crescimento das plantas.

As sementes foram semeadas na superfície de bandejas de plástico planas medindo 52 x 27 x 6 cm e foram cobertas com cúpulas de plástico transparente para minimizar o movimento de sementes. Na primeira etapa, quando as plantas apresentavam folhas verdadeiras, as mudas foram transplantadas individualmente para potes com tamanho de 7,5 x 7,5 x 10 cm, sendo as plantas cultivadas em vasos individuais durante 6 semanas até a coleta do material para a extração de DNA.

3.2.3 Extração DNA *C. canadensis* e *C. bonariensis*

A extração do DNA foi realizada no Jasieniuk Lab, Departament of Plant Science da University of California, Davis, CA. Para a extração de DNA das plantas de *C. canadensis* e *C. bonariensis* foi utilizado o protocolo elaborado por Soltis Lab. (2002) com referências de Doyle e Doyle (1987) e Cullings (1992).

Foram utilizadas as 45 amostras de plantas provenientes do Vale Central da Califórnia. As amostras foram coletadas em casa de vegetação e devidamente identificadas e transportadas para o laboratório em uma caixa contendo gelo. Para a extração de DNA foram utilizados aproximadamente 10-20 mg de folha que foram maceradas em microtubos de 1,5 mL com bastões de plástico usando nitrogênio líquido e, em seguida, foram adicionados 500 µL de Tampão CTAB de extração (Tabela 5). O preparo do Tampão CTAB estoque (Tabela 6) foi realizado com 2 dias de antecedência para poder ser utilizado, e o PVP (polivinilpirrolidona) e β- mercaptoeranol foram acrescentados no momento do uso.

As amostras foram incubadas em banho-maria na temperatura de 55 °C por um período de 1 hora. Em seguida, foram adicionados às amostras 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1 e sendo realizadas suaves inversões dos microtubos para homogeneização. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos com 14.000 r.p.m. para a separação da fase aquosa, proteínas e clorofórmio. A fase aquosa foi pipetada e transferida

para um novo microtubo devidamente identificado. Após estimar o volume, foram adicionados 0,08 do volume de acetato de amônia 7,5 M gelado, e 0,54 do volume de isopropanol gelado.

As amostras foram agitadas suavemente para a homogeneização, sendo incubadas em temperatura de -20 °C por um período de 1 hora. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas com 14.000 r.p.m. formando-se um *pellet* no fundo do microtubo; o líquido sobrenadante foi drenado cuidadosamente. Para a lavagem das amostras, foram adicionados 700 µL de etanol 70% gelado, os microtubos foram agitados cuidadosamente e, em seguida, foram centrifugados por 1 minuto com 14.000 r.p.m.

Após a centrifugação, o etanol foi drenado e, em seguida, foi realizada uma segunda lavagem usando 700 µL de etanol 95% gelado, e os microtubos foram agitados suavemente. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto com 14.000 r.p.m. e, posteriormente, o etanol foi drenado, e as amostras foram secas por 1 hora em temperatura ambiente. As amostras foram resuspendidas com 100 µL de tampão TE buffer (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) e conservadas em um freezer a -20 °C.

Tabela 5. Tampão de extração de DNA utilizado para o processo de extração de DNA de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* segundo a metodologia de Soltis Lab. (2002).

Tampão CTAB Estoque	PVP	β-mercaptoetanol
0,5 mL	0,02 g	2,5 µL
5 mL	0,2 g	25 µL
20 mL	0,8 g	100 µL

*PVP 40 – polivinilpirrolidona 40.

Tabela 6. Reagentes usados para o preparo do tampão CTAB estoque para extração de DNA de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* descrito por Doyle e Doyle (1987), Cullings (1992), segundo a metodologia de Soltis Lab. (2002).

Estoque	Concentração final	1 L
NaCl 5M	1,4 M	280 mL
CTAB 5%	2%	20 g
EDTA 0,5M	20 mM	40 mL
Tris HCl 1M pH 8.0	100 mM	100 mL

3.2.4. Avaliação da qualidade do DNA extraído de *C. canadensis* e *C. bonariensis*

Para verificar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em concentração de 1%, 1,6 µL de brometo de etídio 0,2% preparado com tampão TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 mmol/L EDTA).

Para a análise das amostras, foram utilizados 5 µL de DNA juntamente com 1 µL de corante 6x (Glicerol 3 mL, Azul de Bromofenol 0,025 g e 7,0 mL ddH₂O para 10 mL). As amostras foram submetidas à eletroforese em voltagem de 109 V por um período de 1 hora. Após esse período, as amostras foram fotografadas em foto documentador Kodak EDAS 290 e analisado visualmente a integridade do DNA.

3.2.5. Análise dos locos microssatélites via PCR

A padronização das condições de amplificação do DNA das diferentes amostras de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatensis*) foi realizada no Jasieniuk Lab, Department of Plant Science da University of California, Davis, CA. Foram utilizados *primers* desenvolvidos para *Conyza* testados em oito amostras. A padronização foi realizada para 16 *primers* microssatélites: HW01, HW02, HW06, HW07, HW14, HW27, HW29 (ABERCOMBIE et al., 2009), HW17 (WANG et al., 2008) HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR06, HWSSR07, HWSSR09, HWSSR11, HWSSR12 (OKADA et al., 2013). Foram testadas duas quantidades de DNA (0,5 µL e 1,0 µL por reação) para a padronização. Uma vez que a melhor quantidade de DNA foi estabelecida (1,0 µL), esta foi utilizada na análise para amplificar o DNA das amostras das espécies de *Conyza* e avaliar a diversidade genética existente entre e dentro das amostras.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200. O *mix* das reações foi preparado em microtubos de 1,5 mL e depois foram distribuído em placa multiplex como descrito por Okada et al. (2013), com um volume final de 10 µL cada reação, ddH₂O, 125 µM dNTP, 0,375 unidades de *Taq* polymerase (QIAGEN, Valencia, CA, USA), 1 x PCR buffer (QIAGEN), DNA genômico na concentração 10 ng, 10 µM reverse *primers*, sendo que a quantidade de cada *primer* utilizado apresentou valores diferentes como descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Relação de *primers* microssatélites e suas concentrações usadas na reação de amplificação de amostras de DNA das espécies de *Conyza canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*.

<i>Primers</i>	Concentração do estoque	Volume por 10 μ L de reação
HW01	10 μ M	0,2 μ L
HW02	10 μ M	0,18 μ L
HW06	10 μ M	0,18 μ L
HW07	10 μ M	0,38 μ L
HW14	10 μ M	0,25 μ L
HW17	10 μ M	0,18 μ L
HW27	10 μ M	0,2 μ L
HW29	10 μ M	0,38 μ L
HWSSR01	10 μ M	0,25 μ L
HWSSR03	10 μ M	0,2 μ L
HWSSR04	10 μ M	0,2 μ L
HWSSR06	10 μ M	0,2 μ L
HWSSR07	10 μ M	0,2 μ L
HWSSR09	10 μ M	0,18 μ L
HWSSR11	10 μ M	0,2 μ L
HWSSR12	10 μ M	0,25 μ L

Inicialmente, foi realizada a desnaturação inicial das amostras com 94 °C por 5 minutos. Os ciclos foram realizados com uma desnaturação com 94 °C por 1 minuto; o anelamento foi realizado com 55 °C por 1 minuto e a extensão foi com 72 °C por 1 minuto e trinta segundos. Na segunda etapa foram realizados 34 ciclos em 94 °C e a extensão final em 72 °C por 30 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose com concentração de 2%, 3,2 μ L de brometo de etídio. As amostras foram preparadas com 1 μ L de corante 6x (Glicerol 3mL, Azul de Bromofenol 0,025 gramas e 7,0 mL ddH₂O para 10 mL) e

5 μ L da reação de PCR, e submetidas à separação por eletroforese com 109 V por uma hora. No preparo do gel e corrida eletroforética foi utilizado tampão TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 mmol/L EDTA). Após a eletroforese, as amostras foram fotografadas em foto documentador Kodak EDAS 290.

3.2.6. Análise estatística

Para a análise do produto amplificado para cada *primer* de microsatélite e para cada amostra analisada, os alelos foram lidos como A, B, C e D. Para analisar o número de alelos por loco (Na), número efetivo de alelos (Ne), heterozigosidade média observada (Ho) e esperada (He) foi utilizado o programa POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999). Foram estimados também o coeficiente de endogamia (FIS), déficit de heterozigotos (FIT) e a diversidade genética entre as populações (FST). A matriz de distância genética foi calculada para todas as amostras e usada para plotar o dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Mean Average*) (SNEATH e SOKAL, 1973), utilizando os valores da distância genética de Nei (NEI, 1978).

O polimorfismo nos locos SSR foi analisado, também, usando o programa STRUCTURE *software 2.0* (PRITCHARD et al., 2010), para avaliar o nível de mistura genética entre as três espécies de *Conyza*. Os genótipos foram agrupados com o número de agrupamentos (K) variando de 2 até 14, e a análise foi realizada com período de *length-burning* de 5.000 repetições seguido por 50.000 repetições *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC). O número real de populações (K) é identificado usando o valor máximo de ΔK revelado pelo programa. O número mais provável de subpopulações (K) foi identificado de acordo com o descrito por Evanno et al. (2005). O gráfico resultante do STRUCTURE foi obtido usando o *software* STRUCTURE HARVESTER, um programa utilizado para visualizar o STRUCTURE, implementado pelo método de Evanno (EARL e VONHOLDT, 2011) para uma representação gráfica. O programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012) foi usado para realizar a análise de variância molecular (AMOVA) para estimar a variância dentro e entre as amostras das espécies *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do DNA e da diversidade genética entre as plantas de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*

A avaliação da integridade e a determinação da concentração de DNA de todas as amostras de *C. sumatrensis* foram realizadas utilizando a análise em gel de agarose a 0,8%. A quantificação foi realizada por meio de comparação das bandas das amostras dos diferentes acessos com as do DNA do fago λ de concentrações conhecidas (50, 100, 150 ng). Em função desta comparação, foi possível determinar que a quantidade dos DNAs extraídos e selecionados variou de 10 a 150 ng/ μ L (Figura 2), sendo que algumas amostras ultrapassou 150 ng/ μ L.

A metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990), empregando-se folhas como material biológico, utilizada no presente trabalho, se mostrou eficiente para produzir DNA de qualidade para a amplificação, utilizando *primers* microssatélites, e os resultados destas amplificações foram reproduzíveis.

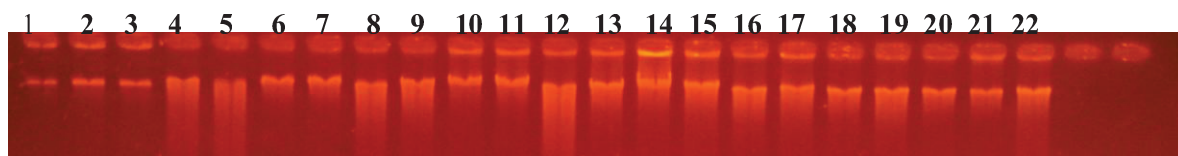


Figura 2. Gel de agarose a 0,8% preparado com tampão TAE com concentração 1X pH 8,0 (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) utilizado para avaliar e quantificar as amostras de DNA. As amostras 1, 2 e 3 são de DNA de fago λ com as concentrações de 50, 100 e 150 ng, respectivamente. As amostras de 4 a 22 são DNAs extraídos de *Conyza sumatrensis*.

Para avaliar a integridade e a determinação da concentração de DNA das amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis*, foi utilizado um gel de agarose 1% (Figura 3). A quantificação foi realizada visualizando a integridade das amostras de DNA; os resultados apresentados foram satisfatórios e os protocolos formulados por Doyle e Doyle, (1987) e Cullings, (1992) apresentaram o melhor resultado para as plantas de *C. canadensis* e *C. bonariensis*.

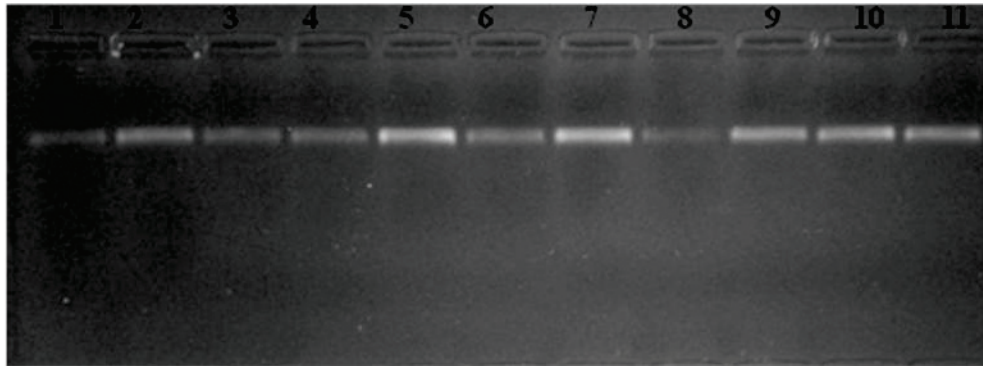


Figura 3. Gel de agarose 1% preparado com tampão TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 mmol/L EDTA) utilizado para avaliar as amostras de DNA. As amostras de 1 a 4 são de *Conyza canadensis*, e 6 a 11 são amostras de *Conyza bonariensis*.

Para avaliar a diversidade genética dentro e entre as espécies de *Conyza*, foram testados um total de 16 pares de *primers* microssatélite. Destes, 12 foram selecionados. Os 12 *primers* (Figura 4 e Figura 5) selecionados no presente trabalho foram aqueles que apresentaram bandas bem definidas e reprodutibilidade dos fragmentos entre as amostras amplificadas.

Portanto, para estudar a diversidade genética das 88 amostras selecionadas das espécies de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*, foram utilizados os pares de *primers*: HW02, HW06, HW07, HW14, HW17, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09 e HWSS11.

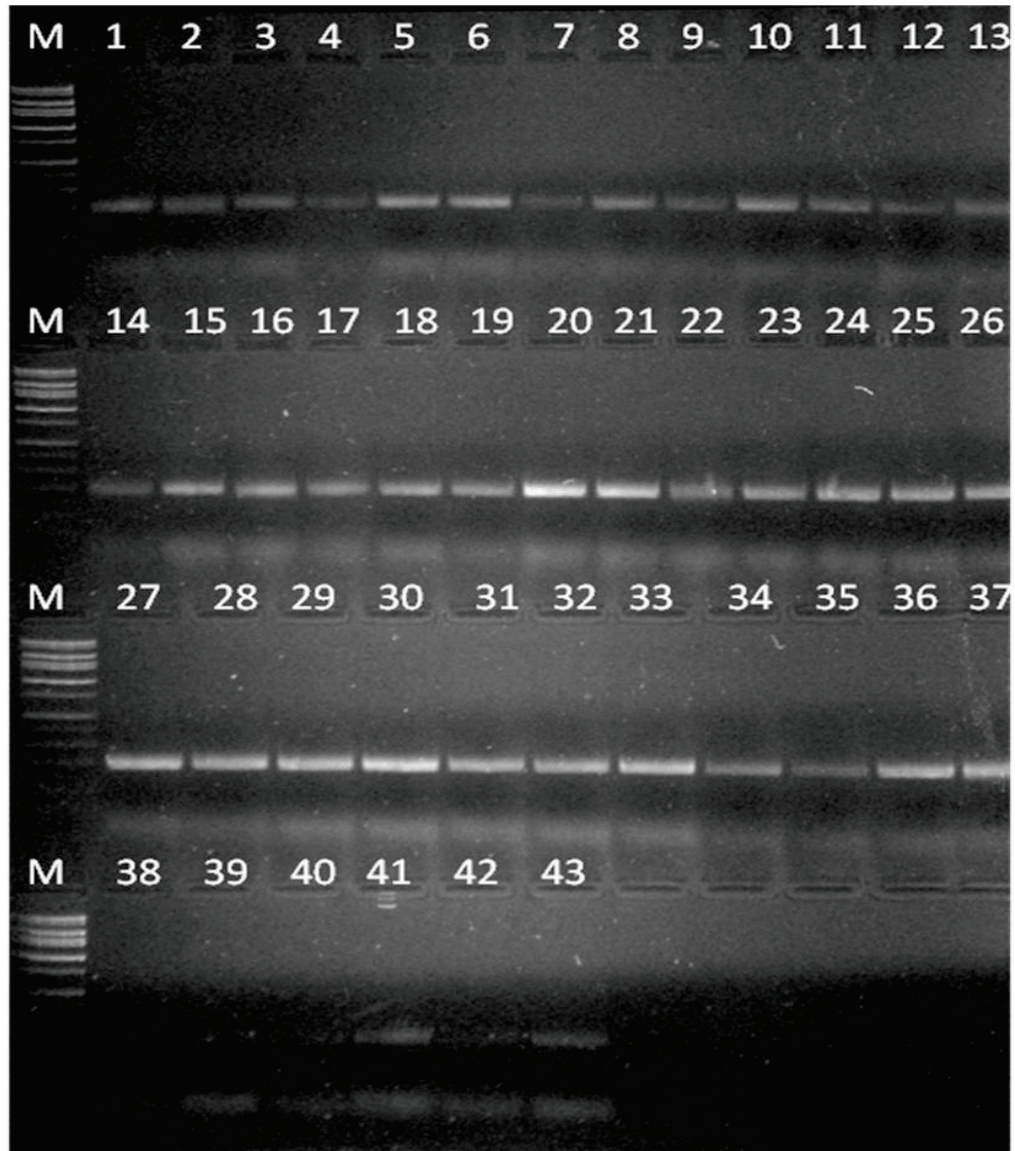


Figura 4. Gel de agarose a 2% utilizado para separar os fragmentos de DNA de *C. sumatrensis* com *primer* HW14. Amostras 1 a 4 Campo Mourão, 5 a 8 Floresta, 9 a 11 Floresta, 12 a 15 Cascavel, 16 a 20 Campo Mourão, 21 a 25 Cafelândia, 26 a 29 Cafelândia, 30 a 33 Peabiru, 34 a 38 Toledo e 39 a 43 Cascavel.

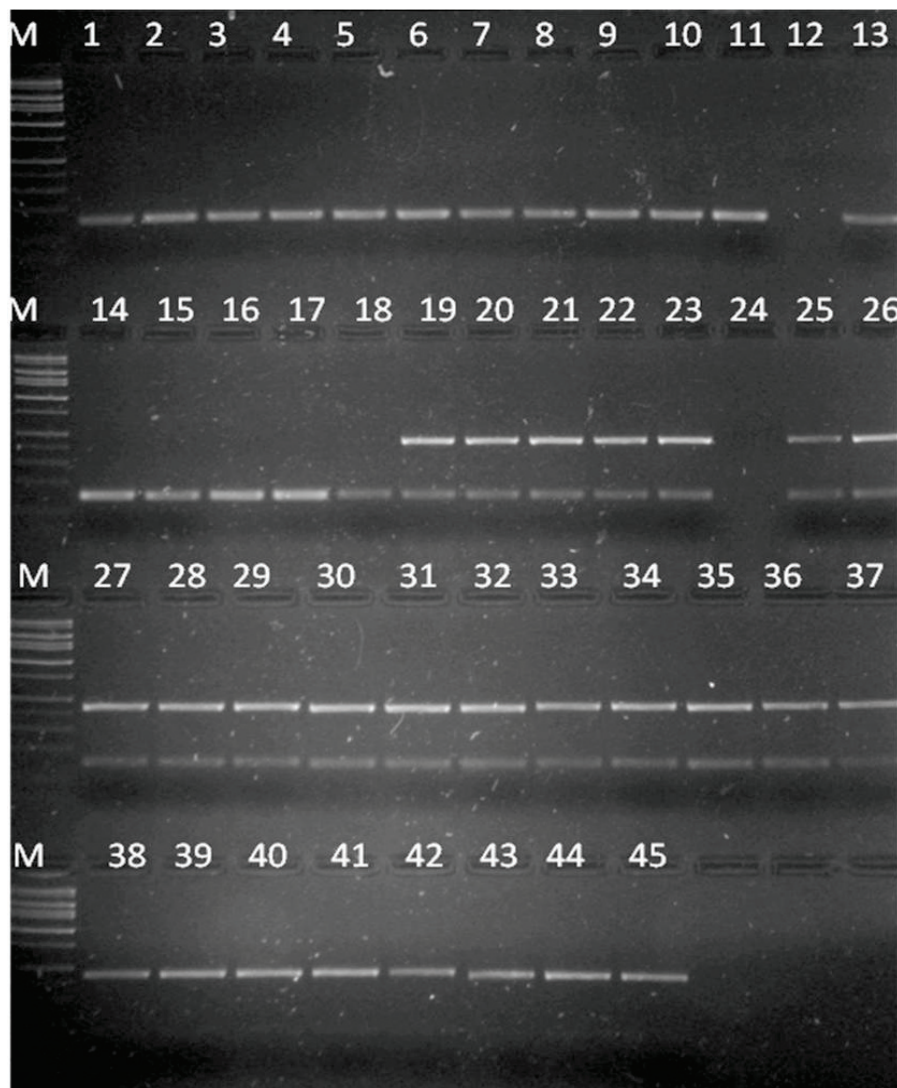


Figura 5. Gel de agarose a 2% utilizado para separar os fragmentos de DNA de *C. canadensis* e *C. bonariensis* com o *primer* HW29. Amostras 1 a 9 plantas de *C. canadensis* resistentes coletadas em Dinuba, CA, amostras 10 ao 18 *C. canadensis* coletadas em Fresno, CA, amostras 19 a 41 plantas de *C. bonariensis* resistentes coletadas em Parlier, CA, amostras 42 a 45 *C. bonariensis* resistência múltipla, coletadas em Parlier, CA.

Na Tabela 8 pode-se observar o número de alelos amplificados em cada um dos 12 locos analisados. *C. sumatrensis* apresentou 4 alelos usando o par de *primer* HWSSR01 para a amplificação do loco *HWSSR01*, sendo este o maior número de alelos encontrado nas amostras de *Conyza*. Na espécie *C. sumatrensis* foi observado maior número de alelos (26) do que os números de alelos observados nas espécies *C. bonariensis* (24) e *C. canadensis* (20), nos 12 locos analisados.

Tabela 8. Número de alelos observados nos 12 locos microssatélites analisados nas três espécies de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*).

Locos	<i>C. canadensis</i>	<i>C. bonariensis</i>	<i>C. sumatrensis</i>
HW02	2	2	2
HW06	2	2	3
HW07	2	2	2
HW14	2	2	2
HW17	2	2	2
HW29	1	2	1
HWSSR01	2	2	4
HWSSR03	2	2	2
HWSSR04	1	2	3
HWSSR07	2	2	2
HWSSR09	1	2	2
HWSSR11	1	2	1
Total	20	24	26

A maior proporção de locos microssatélites polimórficos (91,67%) foi observada nas plantas da espécie *C. bonariensis*, mas o número de alelos por locos ($N_a = 2,1667$), número efetivo de alelos ($N_e = 1,9388$), e heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,4291$), foi maior nas amostras de *C. sumatrensis*, indicando que a diversidade genética é maior na espécie *C. sumatrensis*. As amostras de *C. canadensis* apresentaram a menor diversidade genética (Tabela 9).

Tabela 09. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de plantas das três espécies de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*).

Espécie	N	N_a	N_e	H_o	H_e	P(%)
<i>C. canadensis</i>	18	1,7500	1,5092	0,0370	0,2775	75
<i>C. bonariensis</i>	27	2,0873	1,6481	0,1115	0,3500	91,67
<i>C. sumatrensis</i>	43	2,1667	1,9388	0,1053	0,4291	83,33
Total/Média	88	2,5	2,0194	0,0899	0,4787	100

A maior diversidade de alelos e de valores de heterozigosidade esperada nas espécies *C. sumatrensis* e *C. bonariensis* indica que estas duas espécies tem maior diversidade genética do que a espécie *C. canadensis*, e que o controle deve requerer estratégias adicionais ao controle usado para *C. canadensis*. Isto porque, em amostras com maior diversidade genética, há maior chance de se encontrar exemplares (plantas) que respondem diferentemente às

alterações ou pressões (ação de herbicidas) exercidas pelo ambiente. De acordo com as premissas de Allendorf e Luikart (2007), a existência de variabilidade genética em amostras de uma população aumenta a chance de algumas amostras para responder diferentemente frente a alterações do meio ambiente, de modo que isto possa garantir a preservação da espécie.

No que se refere às plantas daninhas com maior diversidade genética, há uma chance maior de serem selecionadas plantas que não sofrem os efeitos deletérios de aplicações de herbicidas, garantindo a preservação destes exemplares. Embora o significado funcional dos locos microssatélites analisados no presente estudo seja ainda desconhecido, o fato é que existe maior diversidade nas sequências de bases destes locos nas amostras das espécies *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*. Experimentos futuros adicionais poderão ser realizados para testar esta hipótese de que a aplicação de determinada dose de um herbicida seleciona maior número de plantas resistentes nas espécies *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*, do que na espécie *C. canadensis*.

O maior número de alelos ($N_a = 4,0$) foi observado no loco *HWSSR01*, e o maior número efetivo de alelos ($N_e = 2,7574$) e maior valor de heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,6373$) foram observados no loco *HWSSR04*, mas a divergência genética mensurada pelo valor de F_{ST} foi maior no loco *HW29* ($F_{ST} = 0,5366$), indicando que o primer *HW29* parece ser o mais adequado para diferenciar as amostras das três espécies de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*). A Tabela 10 mostra que a diferenciação genética entre as amostras de *Conyza* das três espécies é alta ($F_{ST} = 0,25$).

Tabela 10. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), dos coeficientes de fixação F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965) e o valor do fluxo gênico (Nm) para plantas das três espécies de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*).

Loco	N_a	N_e	H_o	H_e	$F_{(IS)}$	$F_{(IT)}$	$F_{(ST)}$	Nm^*
HW02	2,0	1,9376	0,1538	0,4839	0,6388	0,6875	0,1349	1,6032
HW06	3,0	2,0207	0,0610	0,5051	0,8609	0,8782	0,1243	1,7606
HW07	2,0	1,9936	0,1023	0,4984	0,8057	0,8543	0,2499	0,7504
HW14	2,0	1,9573	0,0568	0,4891	0,8746	0,8957	0,1687	1,2310
HW17	2,0	1,9977	0,0341	0,4994	0,9489	0,9532	0,0835	2,7439
HW29	2,0	1,4495	0,2209	0,3101	0,5758	0,2698	0,5366	0,2159
HWSSR01	4,0	2,6116	0,2174	0,6171	0,5593	0,6479	0,2011	0,9929
HWSSR03	3,0	1,9055	0,0682	0,4752	0,8682	0,9018	0,2548	0,7313
HWSSR04	3,0	2,7574	0,0610	0,6373	0,8763	0,9307	0,4396	0,3188
HWSSR07	3,0	2,5370	0,1034	0,6058	0,6835	0,8038	0,3803	0,4075
HWSSR09	2,0	1,8824	0,0000	0,4688	1,0000	1,0000	0,2307	0,8337
HWSSR11	2,0	1,1827	0,0000	0,1544	1,0000	1,0000	0,1892	1,0714
Média	2,5	2,0194	0,0899	0,4787	0,7648	0,8236	0,2500	0,7499

* Nm = Fluxo gênico estimado de $F_{ST} = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$.

De acordo com Wright (1965), valores de F_{ST} no intervalo 0,01 – 0,05 indicam divergência genética mínima, valores no intervalo 0,05 – 0,15 indicam divergência genética moderada, valores entre 0,15 e 0,25 indicam divergência genética alta. A evidência de que o fluxo gênico é moderado ($Nm = 0,7499$; Tabela 10) na presente análise, pode ser decorrente de troca de alelos entre as espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis*, uma vez que as amostras de *C. sumatrensis* foram coletadas em outro continente (no Brasil, América do Sul).

O valor para o fluxo gênico estimado, quando foram comparadas apenas as amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis* localizadas no mesmo continente, também foi moderado ($Nm = 0,6238$). De acordo com Govindaraju (1989), valores de $Nm < 0,25$ indica fluxo gênico baixo, valores variando entre 0,25 a 0,99 indicam fluxo gênico intermediário, e $Nm > 1,0$ indicam fluxo gênico alto entre as amostras de populações.

Os valores de fluxo gênico podem ser resultado da troca de genes e/ou também da forma de dispersão das sementes. Davis et al. (2009) descrevem que as plantas de *C. canadensis* podem produzir mais de 200.000 sementes que podem ser dispersas pelo vento ou pela água. Dauer et al. (2007; 2009) também descreveram que regularmente a dispersão das sementes de *C. canadensis* pode atingir de 100 a 500 metros da planta de origem, e que estas podem se deslocar a uma distância de 2 a 122 km. Esta ampla forma de dispersão descrita

para a espécie poderia explicar os valores moderados de fluxo gênico encontrados na análise dos locos microssatélites.

A diferenciação genética entre as amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis* coletadas no mesmo continente (América do Norte) também foi alta ($F_{ST} = 0,2861$; resultados não apresentados), indicando que estas duas espécies estão geneticamente bem estruturadas e provavelmente devem requerer estratégias de controle diferencial.

A Tabela 10 mostra, também, valores altos para os coeficientes de Wright (1965) F_{IS} (0,768) e F_{IT} (0,8236) que representam o déficit de heterozigotos nos locos analisados. Embora não haja registros na literatura especializada de valores para autofecundação ou fecundação cruzada nas espécies *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*, o valor alto para o coeficiente de endogamia ($F_{IT} = 0,8336$), mostrado na Tabela 10, está de acordo com a descrição da literatura especializada para *C. canadensis*, onde esta é apresentada como uma espécie autógama, com estimativas que variam de 85-99% de autofecundação em ambientes naturais (WEAVER, 2001; OKADA et al., 2013). Valores altos para coeficientes de endogamia ($F_{IS} = 0,850 - 0,966$) têm sido recentemente registrados por Okada et al. (2013), numa ampla amostra de *C. canadensis*, analisando locos microssatélites.

A análise conjunta dos locos microssatélites das três espécies mostrou que o valor maior de identidade genética ($I = 0,8293$) foi observado entre as espécies *C. canadensis* e *C. sumatrensis* e que as espécies mais divergentes ($I = 0,6303$) foram *C. canadensis* e *C. bonariensis* (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de identidade genética (I) entre as plantas das três espécies de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*).

	<i>C. canadensis</i>	<i>C. bonariensis</i>	<i>C. sumatrensis</i>
<i>C. canadensis</i>	---	0,6303	0,8293
<i>C. bonariensis</i>		---	0,7348
<i>C. sumatrensis</i>			---

Níveis de identidade genética inferiores a 0,85 são frequentemente encontrados entre espécies diferentes (THORPE e SOLÉ-CAVA, 1994), e os valores de identidade genética observados nas amostras das três espécies de *Conyza* ilustram que as mesmas são espécies distintas e estão geneticamente bem estruturadas.

O valor de identidade genética maior, observado entre as espécies *C. canadensis* e *C. sumatrensis*, evidenciado pela análise dos locos microssatélites das amostras das duas espécies, estão condizentes com as indicações feitas na literatura especializada

(URDAMPILLETA et al., 2005; PRUSKI e SANCHO, 2006; VLADIMIROV, 2009; SANTOS, 2012), usando parâmetros morfológicos.

Embora *C. canadensis* esteja descrita na literatura especializada como uma espécie diploide ($2n = 18$; MULLIGAN, 1957; FEDEROV, 1969; THEBAUD e ABBOTT, 1995), e as espécies *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* como sendo hexaploides ($2n = 54$; GOLDBLATT, 1985), a análise dos locos microssatélites mostrou que a espécie diploide *C. canadensis* é geneticamente mais similar à espécie hexaploide *C. sumatrensis*. O valor de similaridade genética entre as duas espécies hexaploides (*C. bonariensis* e *C. sumatrensis*) foi menor ($I = 0,7348$) do que o observado entre uma espécie diploide (*C. canadensis*) e outra hexaploide (*C. sumatrensis*).

A despeito da divergência genética alta representada pelo valor do coeficiente F_{ST} de Wright (1978) ($F_{ST} = 0,250$) entre as amostras das três espécies de *Conyza*, a análise da variância molecular (AMOVA) mostrou maior variação genética dentro das amostras (54%) do que entre as amostras (46%) de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*.

O agrupamento das duas amostras de plantas de *C. canadensis* e *C. bonariensis*, e das 10 amostras de *C. sumatrensis*, de acordo com modelo baseado no algoritmo Baysiano (Figura 6), evidenciou que a maior diversidade genética dentro das amostras é decorrente de maior diversidade dentro da espécie *C. sumatrensis*. No *bar plot*, cada barra no gráfico obtido representa uma planta e a proporção de alelos que cada uma delas compartilha, ou seja, a proporção de mistura de alelos em cada planta. As cores representam os três grupos de alelos correspondendo à proporção diferencial de alelos em cada planta. O valor ótimo de K determinado pela análise Baysiana ($\Delta K2 = 0,00$; $\Delta K3 = 54,1987$; $\Delta K4 = 0,5628$; $\Delta K5 = 0,6588$; $\Delta K6 = 2,3947$; $\Delta K7 = 0,4351$; $\Delta K8 = 0,1652$; $\Delta K9 = 6,5701$; $\Delta K10 = 0,7815$; $\Delta K11 = 0,3592$; $\Delta K12 = 0,9847$; $\Delta K13 = 1,7034$; $\Delta K14 = 0,00$) indicou que as plantas foram agrupadas em três grupos. O *bar plot* obtido para o valor de K obtido ($K = 3$; $\Delta K = 54,1987$) e os resultados foram consistentes com a evidência que os alelos estão misturados em várias amostras de *C. sumatrensis*, e que há pouca mistura de alelos de dois ou três grupos nas amostras de *C. canadensis* e de *C. bonariensis*. Nas amostras de *C. canadensis* ocorre o predomínio de alelos do grupo verde, nas amostras de *C. bonariensis* ocorre predomínio de alelos do grupo azul, e nas amostras de *C. sumatrensis* ocorre o predomínio de alelos do grupo vermelho, mas várias plantas estão compartilhando diferentes proporções significativas dos alelos dos três grupos.

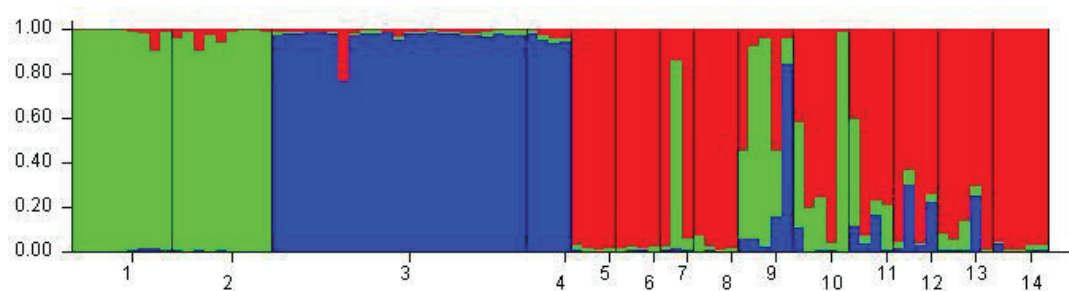


Figura 6. Gráfico *bar plot* obtido de acordo com modelo baseado no algoritmo Baysiano, a partir da análise de locos microssatélites das amostras de plantas de *C. canadensis* (1-2), *C. bonariensis* (3-4) e *C. sumatrensis* (5-14). Cada planta está representada por uma barra vertical uniforme, ou dividida em K segmentos coloridos (K = 3), com tamanhos proporcionais para cada grupo K de alelos, inferido na análise. Cada cor (verde, azul e vermelho) representa a proporção de alelos de cada grupo, ilustrado na barra vertical. Amostra (1): *C. canadensis*-S; (2): *C. canadensis*-R; (3): *C. bonariensis*-R; (4): *C. bonariensis*-2R; (5-14): *C. sumatrensis* [Campo Mourão¹-S (5); Floresta¹-S (6); Floresta²-S (7); Cascavel¹-R (8); Campo Mourão²-S (9); Cafelândia¹-S (10); Cafelândia²-S (11); Peabiru-S (12); Toledo-R (13); Cascavel²-S/R (14)].

O gráfico *bar plot* mostra que as plantas de Campo Mourão²-S compartilham alelos dos três grupos com predomínio de alelos do grupo verde (*C. canadensis*), e plantas compartilhando alelos do grupo azul (*C. bonariensis*) também são evidentes nas amostras de Campo Mourão²-S. Na amostra de Cafelândia¹-S e de Floresta²-S também são evidentes plantas com proporções altas de alelos do grupo verde (*C. canadensis*), e nas amostras de Cafelândia²-S, Peabiru-S e Toledo-R são observadas proporções menores de alelos dos grupos verde e azul.

Nas amostras de *C. sumatrensis*, 40% destas (Campo Mourão¹-S, Floresta¹-S, Cascavel¹-R; Cascavel²-S/R) são mostradas como geneticamente bem estruturadas com alelos do grupo vermelho, mas nas demais localidades ocorrem mistura com alelos que foram definidos como predominantes em amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis* do hemisfério Norte (Vale Central da Califórnia, USA).

Estas evidências conduzem a suspeita de que em determinados locais no estado do Paraná há ocorrência das três espécies de *Conyza*, e pode estar havendo troca de alelos entre elas. Uma suspeita de troca de alelos entre as espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis* tem também sido levantada a partir da análise de locos para isozimas esterases, malato desidrogenase e fosfatase ácida (resultados ainda não publicados).

4.2. Diversidade genética entre as plantas de *C. canadensis* resistentes (*R*), susceptíveis (*S*) e *C. bonariensis* resistentes (*R*) e com resistência múltipla (*2R*)

A proporção de locos microssatélites polimórficos em *C. canadensis-R* (41,67%) e em *C. bonariensis-2R* (50%) foi menor que as proporções observadas nas amostras de *C. canadensis-S* (66,67%) e de *C. bonariensis-R* (91,67%), respectivamente, sugerindo que nos genótipos resistentes e genótipos com resistência múltipla selecionados, ocorre uma redução do polimorfismo nos locos microssatélites. Por outro lado, não parece ocorrer uma redução marcante no número efetivo de alelos e nos valores de heterozigidade média esperada nas amostras de *C. canadensis-R* (Tabela 12).

Tabela 12. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de plantas de *C. canadensis* resistentes (*R*), susceptíveis (*S*) e *C. bonariensis* resistentes (*R*) e com resistência múltipla (*2R*).

Espécie	N	N_a	N_e	H_o	H_e	P(%)
<i>C. canadensis-(R)</i>	9	1,4167	1,3018	0,0370	0,1620	41,67
<i>C. canadensis-(S)</i>	9	1,6667	1,2966	0,0370	0,1898	66,67
<i>C. bonariensis-(R)</i>	23	2,0000	1,5918	0,1163	0,3222	91,67
<i>C. bonariensis-(2R)</i>	4	1,5000	1,3233	0,1042	0,1907	50
Total/Média	45	2,3333	1,8651	0,0799	0,4464	100

Em *C. bonariensis*, as amostras com resistência múltipla apresentaram número efetivo de alelos e heterozigidade média esperada menor do que as amostras somente com resistência ao glifosato. Entretanto, o número de amostras com resistência múltipla analisados foi muito menor que o número de amostras com resistência somente ao glifosato, e pode ser responsável pela aparente redução no número de alelos.

Na Tabela 13 estão evidentes os locos *HWSSR01*, *HWSSR04* e *HWSSR07*, com maiores números efetivos de alelos, e valores de heterozigidade média esperada maiores. No loco *HWSSR04*, foi verificado 100% de divergência genética, indicando que a análise deste loco é mais adequada para diferenciar as amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis*.

Tabela 13. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), dos coeficientes de fixação F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965) e o valor do fluxo gênico (Nm) nas amostras de plantas de *Conyza canadensis* resistentes (R), susceptíveis (S) e *C. bonariensis* resistentes (R) e com resistência múltipla ($2R$).

Loco	N_a	N_e	H_o	H_e	$F_{(IS)}$	$F_{(IT)}$	$F_{(ST)}$	Nm^*
HW02	2,0	1,8292	0,1389	0,4533	0,0211	0,3930	0,3799	0,4010
HW06	2,0	1,6488	0,0769	0,3935	0,8715	0,9027	0,2430	0,7788
HW07	2,0	1,8000	0,0000	0,4444	1,0000	1,0000	0,3986	0,3772
HW14	2,0	1,6423	0,0444	0,3911	0,7203	0,7617	0,1480	1,4396
HW17	2,0	1,9990	0,0000	0,4998	1,0000	1,0000	0,3850	0,3993
HW29	2,0	1,8974	0,4419	0,4730	-0,7600	0,5471	0,7427	0,0866
HWSSR01	3,0	2,0370	0,1429	0,5091	0,6452	0,7209	0,2134	0,9213
HWSSR03	3,0	1,4979	0,0000	0,3279	1,0000	1,0000	0,8063	0,0600
HWSSR04	3,0	2,2727	0,0000	0,5600	---	1,0000	1,0000	0,0000
HWSSR07	3,0	2,7134	0,1136	0,6315	0,6258	0,7806	0,4137	0,3544
HWSSR09	2,0	1,6974	0,0000	0,4109	1,0000	1,0000	0,7375	0,0890
HWSSR11	2,0	1,3563	0,0000	0,2627	1,0000	1,0000	0,5339	0,2183
Média	2,333	1,8651	0,0799	0,4464	0,6628	0,8317	0,5010	0,2490

* Nm = Fluxo gênico estimado de $F_{ST} = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$.

A frequência de alelos também foi altamente diferenciada ($F_{ST} > 0,25$), a partir da análise dos locos *HW02*, *HW07*, *HW17*, *HW29*, *HWSSR03*, *HWSSR07*, *HWSSR09* e *HWSSR11*, indicando que os *primers* para estes locos são adequados para diferenciar amostras das espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis*. De acordo com Wright (1965), valores de $F_{ST} > 0,25$ indicam divergência genética muito alta.

No dendrograma foram formados dois grupos maiores que separam as espécies *C. canadensis* de *C. bonariensis*, e cada grupo foi subdividido, separando as plantas *R* e *S* de *C. canadensis* ($I = 0,7583$), e as plantas *R* e *2R* de *C. bonariensis* ($I = 0,7516$). De acordo com o observado no dendrograma, a diferenciação genética parece maior entre as duas espécies (*C. canadensis* e *C. bonariensis*), do que entre plantas *R* e *S* de *C. canadensis*.

O valor muito alto para a divergência genética global ($F_{ST} = 0,50$; Tabela 13), e o valor baixo para o fluxo gênico ($Nm = 0,2490$; Tabela 13) observados na análise dos locos microssatélites destas duas espécies, sustenta esta indicação de maior diferenciação genética entre as duas espécies (*C. canadensis* e *C. bonariensis*), do que entre as plantas *R* e *S* de *C. canadensis*. O valor de identidade genética maior ($I = 0,7583$) foi observado entre as plantas de *C. canadensis-R* e *C. canadensis-S*, e que as amostras mais divergentes ($I = 0,4546$) foram *C. canadensis-S* e *C. bonariensis-2R* (Tabela 14).

Tabela 14. Valores de identidade genética (I) entre as plantas das *Conyza canadensis* resistentes (R), susceptíveis (S) e *C. bonariensis* resistentes (R) e com resistência múltipla (2R).

	<i>C. canadensis-R</i>	<i>C. canadensis-S</i>	<i>C. bonariensis-R</i>	<i>C. bonariensis-2R</i>
<i>C. canadensis-R</i>	---	0,7583	0,6744	0,5061
<i>C. canadensis-S</i>		---	0,5023	0,4546
<i>C. bonariensis-R</i>			---	0,7516
<i>C. bonariensis-2R</i>				---

O valor de identidade entre as amostras de *C. canadensis-R* e *C. canadensis-S* (I = 0,7563) foi menor que o valor teoricamente esperado para amostras de uma mesma espécie. De acordo com as estimativas de Thorpe e Solé-Cava (1994), níveis de identidade genética inferiores a 0,85 são frequentemente encontrados entre espécies diferentes, ou espécies em processo de especiação por isolamento geográfico. Isto pode indicar que a pressão de seleção de plantas de *C. canadensis* resistentes por ação de herbicidas é forte o suficiente para conduzir a organização de amostras da espécie tão diferenciadas quanto são diferenciadas amostras de diferentes espécies.

4.3. Diversidade genética entre as plantas de *Conyza sumatrensis* (R e S) distribuídas em locais diferentes no estado do Paraná

A maior proporção de locos microssatélites polimórficos (75%), de número de alelos (Na = 2,0833), de número efetivo de alelos (Ne = 1,8016), e de heterozigosidade média esperada (He = 0,3632), foi observada nas amostras de plantas resistentes de Toledo (Tabela 15).

Valores mais altos para número efetivo de alelos (Ne = 1,6804), e de heterozigosidade média esperada (He = 0,3270), também foram observados nas amostras de plantas resistentes de Cascavel, gerando a suspeita de que a ação de herbicidas pode estar selecionando plantas geneticamente mais divergentes (com maior diversidade genética) para os alelos microssatélites analisados no presente estudo.

Tabela 15. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de plantas de *Conyza sumatrensis* (R e S) distribuídas em locais diferentes no estado do Paraná (PR).

Locais (PR)	N	N_a	N_e	H_o	H_e	P(%)
Campo Mourão ¹ -S	4	1,4545	1,3772	0,0682	0,1790	33,3
Floresta ¹ -S	4	1,3636	1,1891	0,0682	0,1222	33,3
Floresta ² -S	3	1,6000	1,4385	0,1000	0,2500	50
Cascavel ¹ -R	4	1,7500	1,6804	0,1250	0,3270	66,67
Campo Mourão ² -S	5	1,5833	1,4217	0,1167	0,2217	50
Cafelândia ¹ -S	5	1,7500	1,4990	0,0667	0,2733	66,67
Cafelândia ² -S	4	1,6667	1,4233	0,1597	0,2532	66,67
Peabiru-S	4	1,5833	1,4175	0,1042	0,2370	58,33
Toledo-R	5	2,0833	1,8016	0,1708	0,3632	75
Cascavel ² -S/R	5	1,4167	1,2238	0,0000	0,1417	41,67
Total/Média	43	2,1664	1,9388	0,1053	0,4291	83,33

O maior número de alelos ($N_a = 4,0$), de número efetivo de alelos ($N_e = 3,1021$), de heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,5767$), e divergência genética mensurada pelo valor de F_{ST} ($F_{ST} = 0,5767$), foi observado no loco *HWSSR01* (Tabela 16), indicando que o *primer* *HWSSR01* pode ser recomendado para diferenciar amostras de *C. sumatrensis*.

Valores altos para F_{ST} ($F_{ST} > 0,50$) foram observados também com o uso dos *primers* *HW14*, *HW17*, *HWSSR04* e *HWSSR07*, mostrando que estes *primers* podem ser usados para encontrar marcadores moleculares para diferenciar amostras de *C. sumatrensis*. A Tabela 16 mostra que a diferenciação genética entre todas as amostras de *C. sumatrensis* distribuídas nos diferentes locais do estado do Paraná é muito alta ($F_{ST} = 0,4822$).

Tabela 16. Estimativa do número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), dos coeficientes de fixação F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965) e o valor do fluxo gênico (Nm) nas amostras de plantas de *Conyza sumatrensis* (*R e S*) distribuídas em locais diferentes no estado do Paraná (PR).

Loco	N_a	N_e	H_o	H_e	$F_{(IS)}$	$F_{(IT)}$	$F_{(ST)}$	Nm^*
HW02	2,0	1,9898	0,1667	0,4974	0,3478	0,6256	0,4260	0,3369
HW06	3,0	2,3736	0,0465	0,5787	0,8027	0,8990	0,4883	0,2620
HW07	2,0	1,8974	0,2093	0,4730	0,3934	0,5763	0,3015	0,5792
HW14	2,0	1,9331	0,0698	0,4827	0,6501	0,8430	0,5513	0,2035
HW17	2,0	1,9957	0,0698	0,4989	0,7090	0,8693	0,5507	0,2039
HW29	1,0	1,0000	0,0000	0,0000	---	---	0,0000	---
HWSSR01	4,0	3,1021	0,3333	0,6776	0,4054	0,7483	0,5767	0,1835
HWSSR03	2,0	1,9733	0,1395	0,4932	0,5346	0,7075	0,3716	0,4228
HWSSR04	3,0	2,4556	0,1351	0,5928	0,6726	0,8306	0,5101	0,2401
HWSSR07	2,0	1,5551	0,0930	0,3569	0,4194	0,7288	0,5329	0,2192
HWSSR09	2,0	1,9903	0,0000	0,4976	1,0000	1,0000	0,4784	0,2725
HWSSR11	1,0	1,0000	0,0000	0,0000	---	---	0,0000	---
Média	2,1667	1,9388	0,1053	0,4291	0,5901	0,7878	0,4822	0,2685

* Nm = Fluxo gênico estimado de $F_{ST} = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$.

De acordo com Wright (1965), valores de F_{ST} no intervalo 0,01 – 0,05 indicam divergência genética mínima, valores no intervalo 0,05 – 0,15 indicam divergência genética moderada, valores entre 0,15 e 0,25 indicam divergência genética alta, e valores $F_{ST} > 0,25$ indicam divergência genética muito alta. Desta forma, embora o número médio de alelos nos locos microssatélites analisados seja pequeno ($N_a = 2,1667$) nas 43 amostras de *C. sumatrensis* distribuídas em 10 locais diferentes no estado do Paraná, a frequência destes alelos é diferente o suficiente para caracterizar estas amostras como geneticamente diferenciadas. Há alelos comuns a todas as amostras nos locos *HW29* (*HW29^l*) e *HWSSR11* (*HWSSR11^l*) que determinam ausência de diferenciação genética ($F_{ST} = 0,00$), mas a frequência diferencial dos demais alelos nos outros locos foi suficiente para determinar a estruturação genética das 10 amostras analisadas. Valores muito altos de divergência genética (F_{ST} variando de 0,034 a 0,753) também foram descritos em 42 populações de *C. canadensis* distribuídas no Vale Central da Califórnia (OKADA et al., 2013), e estes foram atribuídos ao sistema de reprodução da espécie. Uma alta diferenciação genética entre populações é o esperado em espécies onde prevalece o sistema de auto-polinização (HAMRICK e GODT, 1996).

A evidência de que o fluxo gênico é moderado ($N_m = 0,2628$; Tabela 16) deve contribuir para determinar maior diferenciação entre as amostras. De acordo com Govindaraju (1989) valores de $N_m < 0,25$ indicam fluxo gênico baixo, valores variando entre 0,25 a 0,99 indicam fluxo gênico intermediário e $N_m > 1,0$ indicam fluxo gênico alto entre as amostras de populações. As evidências nos locos microssatélites das plantas de *C. sumatrensis* nestas 10 regiões do Paraná são de que as amostras estão geneticamente estruturadas e provavelmente devem requerer estratégias de controle diferencial.

O menor valor de identidade genética ($I = 0,5297$) foi observado entre as amostras de plantas de *C. sumatrensis* de Cafelândia¹-S e Cascavel²-S/R, e o maior valor ($I = 0,9409$) foi observado entre as amostras de plantas de *C. sumatrensis* de Cafelândia¹-S e Cascavel²-S/R.

No dendrograma foram formados 2 grupos maiores, cada um deles subdividido em dois outros grupos menores. O primeiro grupo maior foi formado com as amostras de plantas de *C. sumatrensis* de Campo Mourão¹-S, Cascavel-R, Cafelândia¹-S, Peabiru-S, Cascavel²-S/R e Toledo-R, e o segundo grupo maior com as amostras de Floresta¹-S, Floresta²-S, Campo Mourão²-S, e Cafelândia²-S. Embora todas as plantas R tenham se concentrado no primeiro grupo, valores de identidade genética maiores foram observados entre plantas R e S ($I = 0,9209$ entre Campo Mourão¹-S e Cascavel-R), do que entre plantas R ($I = 0,8085$ entre Cascavel-R e Toledo-R).

Esta observação indica que a ação de herbicidas na seleção de genótipos de *C. sumatrensis* resistentes, não está selecionando os mesmos alelos, ou a mesma frequência destes alelos nos locos microssatélites analisados, de uma maneira uniforme nas plantas resistentes. Evidências de origem múltipla e, independente para a resistência ao glifosato, têm sido descritas recentemente para a espécie *C. canadensis* por Okada et al. (2013), num estudo sobre a evolução e disseminação de resistência ao glifosato em populações do Vale Central da Califórnia. Tais evidências (origem múltipla e independente para a resistência ao glifosato), se estendidas para a espécie *C. sumatrensis*, explicariam uma maior divergência encontrada entre as amostras resistentes (Cascavel-R e Toledo-R) do que entre amostras susceptíveis e resistentes (Campo Mourão¹-S e Cascavel-R).

Por outro lado, é possível que diversidade de modos de aplicação de herbicidas (princípios ativos e doses diferentes) possa levar a um processo de seleção diferenciada de genótipos resistentes. Em princípio, a suposta pressão de seleção por ação de herbicidas em plantas de *C. sumatrensis* não parece selecionar alelos específicos nos 12 locos microssatélites (HW02, HW06, HW07, HW09, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04,

HWSSR07, HWSSR09 e HWSSR11) analisados; a frequência dos alelos não parece ser igualmente afetada pelo uso de herbicidas para o controle da espécie.

5. CONCLUSÕES

- As espécies *Conyza canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* podem ser claramente diferenciadas em nível molecular usando os *primers* HW07, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09 e HWSSR11, para locos microssatélites; as três espécies de *Conyza* formam populações geneticamente estruturadas.
- A análise dos locos microssatélites mostrou que a diversidade genética é maior nas espécies de *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*; a espécie de *C. canadensis* foi a que apresentou a menor diversidade genética.
- A seleção de genótipos resistentes ao glifosato em *C. canadensis* reduz a proporção de locos microssatélites polimórficos, mas o número efetivo de alelos e os valores de heterozigosidade média observado, e esperado, são equivalentes nos genótipos sensíveis e resistentes, indicando que *C. canadensis-S* e *C. canadensis-R* tem o mesmo potencial para colonizar novas áreas de infestação.
- A aplicação de herbicidas na seleção de genótipos resistentes de *C. sumatrensis* nos municípios de Campo Mourão, Floresta, Cascavel, Cafelândia, Peabiru e Toledo, do estado do Paraná, não reduz os valores de heterozigosidade média, observados e esperados, indicando que *C. sumatrensis-S* e *C. sumatrensis-R* tem o mesmo potencial para colonizar novas áreas de infestação.
- A aplicação de herbicidas para o controle de *C. sumatrensis* nos municípios de Campo Mourão, Floresta, Cascavel, Cafelândia, Peabiru e Toledo, do estado do Paraná, tem selecionado amostras da espécie que são geneticamente divergentes.
- As amostras de *C. sumatrensis* dos municípios de Campo Mourão, Cafelândia, Floresta, Peabiru e Toledo, compartilham alelos característicos das espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis*, indicando que há troca de alelos entre as três espécies de *Conyza* na referida região.
- Nos municípios de Campo Mourão e Cafelândia há exemplares de *Conyza* com características em nível molecular para locos microssatélites de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*.

6. REFERÊNCIAS

- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. **Blackwell Publishing Maden**, 642 p., 2007.
- ABERCROMBIE, L.G.; ANDERSON, C.M.; BALDWIN, B.G.; BANG, I.C. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 January 2009–30 April 2009. **Molecular Ecology Resources**, v.9, p. 1375-1429, 2009.
- AMSELLEM, L.; NOYER, J.L.; LE BOURGEOIS, T.; HOSSAERT-MCKEY, M. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 443–455, 2000.
- ANDENBERG, A.A.; BALDWIN, B.G.; BAYER, R.G.; BREITWIESER, J.; JEFFREY, C.; DILLON, M.O.; ELDEÑAS, P.; FUNK, V.; GARCIA-JACAS, N.; HIND, D.J.N.; KARIS, P.O.; LACK, H.W.; NESON, G.; NORDENSTAM, B.; OBERPRIELER, CH.; PANERO, J.L.; PUTTOCK, C.; ROBINSON, H.; STUESSY, T.F.; SUSANNA, A.; URTUBEY, E.; VOGT, R.; WARD, J.; WATSON, L.E.. Compositae. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey (Eds.). Flowering Plants Eudicots Asterales, Vol. VIII. The Families and Genera of Vascular Plants, K. Kubitzki (Ed.). **Springer Verlag**, p. 61- 588, 2007.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, v.3, p. 237-315, 1991.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores Moleculares. 2. ed. Universidade Federal de Viçosa, 532 p. 2009.
- BORGES, R.A.X.; FORZZA, R.C. A tribo Astereae (Asteraceae) no parque estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 26, 131-154, 2008.
- BOSSDORF, O.; AUGÉ, H.; LAFUMA, L.; ROGERS, W.E.; SIEMANN, E.; PRATI D. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. **Oecologia**, v. 5, p. 1–11, 2005.
- BUHLER, D.D. Influence of tillage systems on weed population dynamics and management in corn and soybean production in the central USA. **Crop Science**, v. 35, p. 1247-1257, 1995.

- BUHLER, D. D. Population dynamics and control of annual weeds in corn (*Zea mays*) as influenced by tillage systems. **Weed Science**, v.40, p. 241–248, 1992.
- BHOWMIK, P.C.; BEKECH, M.M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy**, v. 1, p. 67-71, 1993.
- BLANCO, H.G. A importância dos estudos ecológicos nos programas de controle das plantas daninhas. **O Biológico**, v. 38, p. 343-50, 1972.
- CANCELLI, R.R.; MACEDO, R. B.; GUERREIRO, C.T.; BAUERMANN, S.G. Diversidade polínica em *Asteraceae martinov* da fazenda São Maximiano, Guaíba, RS. **Pesquisa Botânica**, v. 56, p. 209-228, 2005.
- CARTER, M.C.; SYTSMA, M.D. Comparison of the genetic structure of North and South American populations of a clonal aquatic plant. **Biological Invasions**, v. 3, p.113–118, 2001.
- CARVALHO, A.Z. Transferabilidade de microssatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose. Dissertação de mestrado, Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, 51 p., 2007.
- CASE, C.N.; CRAWLEY, M.J. Effect of interspecific competition and herbivory on the recruitment of an invasive alien plant: *Conyza sumatrensis*. **Biological Invasions**, v. 2, p. 103-110, 2000.
- CULLINGS, K.W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 233-240, 1992.
- CZECZOT, H.; TUDEK, B.; KUSZTELAK, J.; SZYMCZYK, T.; DOBROWOLSKA B.; GLINKOWSKA, G. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. **Mutation Research**, v. 5, p. 209–216, 1990.
- DAUER, J.T.; MORTENSEN, D.A.; VANGESSEL, M.J. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. **Journal of Applied Ecology**, v. 44, p. 105-114, 2007.
- DAUER, J.T.; MORTENSEN, D.A.; E.C.; LUSCHEI, E.C.; ISARD, S.A.; SHIELDS, E.J.; VANGESSEL, M. *Conyza canadensis* seed ascent in the lower atmosphere. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 149, p. 526-534, 2009.

DAVIS, V.M.; KRUGER, G.R.; STACHLER, J.M.; LOUX, M.M.; JOHNSON, W.G. Growth and seed production of horseweed (*Conyza canadensis*) populations resistant to glyphosate, ALS-inhibiting, and multiple (glyphosate + ALS-Inhibiting) herbicides. **Weed Science**, v. 57, p. 494-504, 2009.

DEMORE, P.S. Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites para resistência ao oídio em soja. Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Campus de Jaboticabal. Dissertação de mestrado, 45p., 2008.

DING, J.Q.; MACK, R.N.; LU, P.; REN, M.X.; HUANG, H.W. China's booming economy is sparking and accelerating biological invasions. **Bioscience**, v. 58, p. 317-324, 2008.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

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

EARL, D.; VONHOLDT, B. Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetic Resources**, v. 4, p. 359-361, 2011.

EVANNO, G.; REGNAUT, S; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

FEDEROV, A.A. Chromosome numbers of flowering plants. Academy of Sciences of U.S.S.R., Komarov Botanical Institute Leningrad, 1969.

FENNER, M. Relationships between seed weight, ash content and seedling growth in twenty-four species of Compositae. **New Phytologist**, v. 95, p.697-706, 1983.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

FRANKTON, C.; MULLIGAN, G.A. Weeds of Canada (revised). Toronto: NC, 217p., 1987.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. **ACADCOM** Gráfica e Editora Ltda. 67p., 2005.

- GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers: 1982-1983. Monographs in Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden, v.13, p. 1-224, 1985.
- GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. Microsatellites evolution and application. **Oxford University Press**, 1998.
- GONZALEZ-TORRALVA F.; CRUZ-HIPOLITO H.; BASTIDA F.; MUELLEDER N.; SMEDA R.J.; DE PRADO R. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4361–4366, 2010.
- GORSKI, T. Germination of seeds in the shadow of plants. **Physiologia Plantarum**, v. 34, p. 342-346, 1975.
- GOULART, I.C.G.R.; MEROTTO JUNIOR, A.; NUNES, A.L.; BERED, F. Otimização da utilização de marcadores moleculares microsatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1175-1181, 2011.
- GOVINDARAJU, D.R. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. **Journal Evolution Biology**, v. 2, p. 173-181, 1989.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences**, v. 351, p. 1291–1298, 1996.
- HASSEL, K.; STASTAD, S.M.; GUNNARSSON, U.; SO“DERSTRO, M.L. Genetic variation and structure in the expanding moss *Pogonatum dentatum* (Polytrichaceae) in its area of origin and in a recently colonized area. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1684–1690, 2005.
- HAO, J.H.; QIANG, S.; LIU, Q.Q.; CAO, F. Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 3, p. 245-254, 2009.
- HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds. Disponível: www.weedscience.org, consultado em 19/05/13, 2012.
- HEAP, I. The international survey of herbicide resistant weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org/in.asp>, consultado em: 20/09/2013, 2011.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. CIMMYT, v. 2, 88 p., 1994.

- HOLM, L.; DOLL, J.; HOLM, E.; PANCHO, J.; HERBERGER, J. World weeds: Natural histories and distribution. John Wiley & Sons Inc., ON. p. 226–235, 1997.
- HU, J.; TRANEL, P.J.; STEWART JR. C.N.; YUAN J.S. Molecular and genomic mechanisms of non-target site herbicide resistance. In: C.N. Stewart, Jr., ed. Genomics of Weedy and Invasive Plants. **Blackwell Scientific**, p. 149-161, 2009.
- HUSBAND, B.C.; BARRETT, S.C.H. Colonization history and population genetic structure of *Eichornia paniculata* in Jamaica. **Heredity**, v. 66, p. 287–296, 1991.
- JACOB, J.; KELSOE, G.; RAJEWSHY, K.; WEISS, U. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. **Nature**, v. 354, p. 389-392, 1991.
- JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A.L.; MORRISON, I.N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v. 44, p. 176-193, 1996.
- KAPUSTA, G. Seedbed tillage and herbicide influence on soybean (*Glycine max*) weed control and yield. **Weed Science**, v. 27, p. 520–526, 1979.
- KISSMAN, K.G. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. Disponível em: http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto_resistencia_herbicidas.doc. Acesso em 02 de Janeiro de 2014.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2. ed. São Bernardo do Campo: Basf, p. 152-156, 1999.
- LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Resistência ao glyphosate em biótipos de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, v. 26, p. 467-471, 2008.
- LASSERRE, B.; KAISER, R.; CHANH, P.H.; IFANSYAH, N.; GLEYE, J. Effects on rats of aqueous extracts of plants used in folk medicine as antihypertensive agents: *Ribes nigrum*, *Olea europaea*, *Leonotis nepetaefolia*, *Ilex aquifolium*, *Viscum album*, *Erigeron canadensis*, *Solidago virga-aurea*. **Naturwissenschaften**, v. 7, p. 95–96, 1983.
- LEROUX, G.D.; BENOIT, D.L.; BANVILLE, S. Effect of crop rotations on weed control, *Bidens cernua* and *Erigeron Canadensis* populations, and carrot yields in organic soils. **Crop Protection**, v. 15, p. 171–178, 1996.

- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed in-vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Genetic**, v. 44, p. 397-101, 1989.
- LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: Plantio direto e convencional. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, v. 5. 339 p., 2000.
- LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2000. 3. Ed.
- MARSHALL, E.J.P.; BROWN, V.K.; BOATMAN, N.D.; LUTMAN, P.J.W.; SQUIRE, G. R.; WARD, L.K. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. **European Weed Research Society Weed Research**, v. 43, p. 77–89, 2003.
- MISSIAGGLIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multipletailed primers. **Genetic Molecular Research**, v. 5, p. 72-78, 2006.
- MIYAZAWA, M.; YAMAMOTO, K.; KAMEOKA, H. The essential oil of *Erigeron canadensis*. **Essential Oil Resistance**, v. 4, p. 227–230, 1992.
- MONDIN, C.A. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteraceas brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. 1ed. Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre: Pallotti, 2006.
- MOODY, M.E.; MUELLER, L.D.; SOLTIS, D.E. Genetic variation and random drift in autotetraploid populations. **Genetics**, v.7, p. 649–655, 1993.
- MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; GALLI, A.J.; MONTEZUMA, M.C.; MAROCHI, A.I.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de buva (*Conyza canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros do estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25. Brasília, 2006. **Resumos Expandidos**. Brasília: SBCPD, 2006. (CD-ROM).
- MULLIGAN, G.A. Chromosome numbers of *Canadian* weeds. I. **Canadian Journal Botany**, v. 35, p. 779–789, 1957.
- NANDULA, V.K.; EUBANK, T.W.; POSTON, D.H.; KOGER, C. H.;REDDY, K.N. Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v. 54, p. 898-902, 2006.

- NAKAJIMA, N.J.; SEMIR, J. *Asteraceae* do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 471-478, 2001.
- NEVE, P.; VILA-AIUB, M.; ROUX, F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Phytologist**, v. 184, p. 783-793, 2009.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 538–590, 1978.
- NEI, M. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, v. 3, p. 460-465, 1972.
- NOVAK, S.J.; WELFLEY, A.Y. Genetic diversity in the introduced clonal grass *Poa bulbosa* (Bulbous bluegrass). **Northwest Science**, v. 71, p. 271–280, 1997.
- NOYES, R.D. Biogeographical and evolutionary insights on *Erigeron* and allies 799 (*Asteraceae*) from ITS sequence data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 220, p. 93-114, 2000.
- OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal Agricultural Science**, v. 144, p. 31-43, 2006.
- OKADA, M.; BRADLEY, D. H.; KURT J. H.; YANHUI P.; SHRESTHA, A.; STEWART JR, C. H.; STEVEN D. W.; JASIENIUK, M. Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* in California. **Evolutionary Applications**, v. 6, p. 761-777, 2013.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.
- PIMENTEL, D.; LACH, L.; ZUNIGA, R.; MORRISON. D. Environmental and economic costs of non indigenous species in the United States. **BioScience**, v.50, p. 53-65, 2000.
- PITELLI, R.A. Competição e Manejo em culturas Anuais. **A Granja**, v. 37, p. 111-113, 1981.
- PITELLI, R.A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, v. 11, p. 16-27, 1985.
- POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review Plant Biology**, v. 61, p. 317–47, 2010.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, X.; FALUSH, D. Documentation for structure software: version 2.3. 2010.
- PRUSKI, J.F.; SANCHO, G. *Conyza sumatrensis* var. *leiotheca* (Compositae: Astereae), a new combination for a common neotropical weed. **Novon**, v. 16, p. 96-10, 2006.

REGEHR, D.L.; BAZZAZ, F.A. The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a successional winter annual. **Journal of Ecology**, v. 3, p. 923-933, 1979.

ROLLIN, M.J.; TAN, D. Fleabane: first report of glyphosate resistant flax-leaf fleabane from western Darling Downs. 2004. Acessado em: 26 jun. 2013. Online. Disponível na Internet: http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings%20_mar_04.pdf.

ROULEAU, E.; LAMOUREUX, G. Atlas of the vascular plants of the island of Newfoundland and of the islands of Saint-Pierre-et-Miquelon. Quebec: Groupe Fleurbec, 1992. 777p.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. Salvador: **EDUFBA**, 2008.

SAKAI, A. K.; ALLENDORF, F.W.; HOLT, J.S.; LODGE, D.M; MOLOFSKY, J.; WITH, K. A.; BAUGHMAN, S.; CABIN, R.J.; COHEN, J.E.; ELLSTRAND, N.C.; MCCAULEY, D.E.; O'NEIL, P.; PARKER, I.M.; THOMPSON, J. N.; WELLER, S. G. The population biology of invasive species. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 32, p. 305–332, 2001.

SANTOS, G. Resistência múltipla ao glyphosate e ao chlorimuron-ethyl em biótipos de *Coryza sumatrensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós Graduação em Agronomia, 2012.

SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R. Biologia e controle de plantas daninhas. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior – ABEAS. Brasília, DF: ABEAS; Viçosa, MG: UFV, 268 p., 2006.

SILVA, A.A.; SILVA, J.F.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R; SILVA, J.F.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; VARGAS, L. Viçosa. Proteção de plantas, Manejo de plantas daninhas, Brasília, DF: ABEAS; Viçosa, MG, UFV, 268p., 2006.

SOLTIS LAB CTAB DNA EXTRACTION PROTOCOL. The Soltis Lab, Florida Museum of Natural History, 2002. Disponível em:

http://www.flmnh.ufl.edu/soltislab/Soltis_site/Protocols_files/CTAB%20DNA%20Extraction.pdf acessado em 04 de Janeiro, 2014.

SOUZA, I.F. Controle de Plantas Daninhas. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MAIOMONI-RODELLA, R.C.S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v. 3, p. 343-354, 2003.

SHRESTHA, A.; HEMBREE, K.; WRIGHT, S. Biology and Management of Horseweed and Hairy Fleabane in California. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 2008.

SHAW, W. Terminology. Committee Report, Weed Society of America. **Weed**, v.4, 278 p., 1956.

SMISEK, A.; DOUCET, C.; JONES, M.; WEAVER, S.E. Paraquat resistance in horseweed (*Conyza canadensis*) and Virginia pepperweed (*Lepidium virginicum*) from Essex County, Ontario. **Weed Science**, v. 46, p. 200-204, 1998.

SMISEK, A.J.J. The evolution of resistance to paraquat in populations of *Erigeron canadensis* L. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia-Ecologia) - University of Western Ontario, London, 1995.

SMITH, M.; MOSS, J.S. An experimental investigation, using stomatal conductance and fluorescence, of the flood sensitivity of *Boltonia decurrens* and its competitors. **Journal Applied Ecology**, v. 35, p. 553–561, 1998.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: **Freeman**, 573 p., 1973.

STEINMAUS, S.J.; PRATHER, S.T.; HOLT, S.J. Estimation of base temperatures for nine weed species. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 275-286, 2000.

STOECKER, M.A.; SMITH, M.; MELTON, E.D. Survival and aerenchyma development under flooded conditions of *Boltonia decurrens*, a threatened floodplain species and *Conyza canadensis*, a widely distributed competitor. **American Midland Naturelist**, v. 134, p. 117–126, 1995.

STEWART, C.N.; TRANEL JR. P.J.; HORVATH, D.P.; ANDERSON, J.; RIESEBERG, V.; WESTWOOD, L.H.; MALLORY-SMITH, J.H.; ZAPIOLA, M.L.; DLUGOSCH, K.M. Evolution of weediness and invasiveness: charting the course for weed genomics. **Weed Science**, v. 57, p. 451–462, 2009.

STRZELECKA, H.; GLINKOWSKA, G. Studies on the chemistry of *Erigeron canadensis*. Part 1. **Herba Polonica**, v. 27, p. 201–212, 1981.

- TEHON, L.R. The drug plants of Illinois. Illinois Natural History Survey, Circular 44, **Natural History Survey Division Urbana**, 135 p., 1951.
- THEBAUD, C.; ABBOTT, R.J. Characterization of invasive *Conyza* species (*Asteraceae*) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. **American Journal of Botany**, v. 3, p. 360-368, 1995.
- THEBAUD, C.; FINZI, A.C.; AFFRE, L.; DEBUSSCHE, M.; ESCARRE, J. Assessing why two introduced *Conyza* differ in their ability to invade Mediterranean old fields. **Ecology**, v. 77, p. 791-804, 1996.
- THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematic. **Zoologica Scripta**, v. 23, p. 3-18, 1984.
- TREMMELE, C.D.; PETERSON, K.M. Competitive subordination of a piedmont old field successional dominant by an introduced species. **American Journal of Botany**, v. 8, p. 1125-1132, 1983.
- URDAMPILLETA, J.D.; AMAT, A.G.; BIDAU, C.J. Karyotypic and studies and morphological analysis of some reproductive features in five species of *Conyza* (*Asteraceae*: *Astereae*) from Northeastern Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 40, p. 91-99, 2005.
- USDA - United States Department of Agriculture. Selected weeds of the United States. Washington: Agriculture Research Service, **Agriculture Handbook**, v. 366, 463 p., 1970.
- VANGESSEL M.J. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, v. 49, p. 703-705, 2001.
- VARGAS, L.; BIANCHI, M.A.; RIZZARDI, M.A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T et al. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, v. 3, p. 573-578, 2007.
- VLADIMIROV, V. *Erigeron sumatrensis* (*Asteraceae*): a recently recognized alien species in the Bulgarian flora. **Phytologia Balcânica**, v. 1, p. 361-365, 2009.
- VENABLE, D.L.; LEVIN, D.A. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 143, p.1-16, 1983.
- VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Palotti, 1997, 165 p.

- 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.; MEROTTO JR., A. Herbicidologia. Porto Alegre: **Evangraf**, 152 p. 2001.
- WALKER, S. Fleabane: summary of discussion and recommendations. 2004. Acessado em: 12 de Julho 2013. Online. Disponível na Internet:
[http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings% 20_mar_04.pdf](http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings%20_mar_04.pdf).
- WANG, X.; TRIGIANO, R.N.; STEWART, N.C.; WADL, P.A.; GOOD, L.L.; SCHEFFLER, B.E.; RINEHART, T.A. Microsatellites from *Conyza canadensis* (horseweed). **Entomology and Plant Pathology**, University of Tennessee, USA, 2008.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, Information Retrieval, 1992.
- WEAVER, S.E. The biology of Canadian weeds; *Conyza canadensis*. **Journal of Plant Science**, v. 81, p. 867-875, 2001.
- WIESE, A. F.; SALISBURY, C.D.; BEAN, B.W. Downy brome (*Bromus tectorum*), jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) and horseweed (*Conyza canadensis*) control in fallow. **Weed Technology**, v. 9, p. 249–254, 1995.
- WICKS, G.A.; BURNSIDE C.; FELTON, W.L. Weed control in conservation tillage systems. In P. W. Unger, ed. Managing Agricultural Residues. Boca Raton, FL: **Lewis Publishers**, p. 211-244, 1994.
- WILCOVE, D.S.; ROTHSTEIN, D.; DUBOW, J.; PHILLIPS, A.; LOSOS, E. Quantifying threats to imperiled species in the United States. **Bioscience**, v. 48, p. 607–615, 1998.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-399, 1965.
- WRIGHT, S. Variability within and among populations. Chicago: University of Chicago Press, 580 p., 1978.
- WU, H.; WALKER, S. Fleabane: fleabane biology and control. 2004. Acessado em: 28 jun. 2013. Online. Disponível na Internet:
[http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings% 20_mar_04.pdf](http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings%20_mar_04.pdf).
- WURZELL, B. *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker established in England. **Watsonia**, v. 17, p. 145-148, 1988.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, 1999.

YUAN, J.S.; ABERCROMBIE, L.L.G.; CAO, Y.; HALFHILL, M.D.; ZHOU, X.; PENG, Y.; HU, J.; RAO, M.R.; HECK, G.R.; LAROSA, T.J.; SAMMONS, D.; WANG, X.; RANJAN, P.; JOHNSON, D.H.; WADL, P.A.; SCHEFFLER, B.E.; RINEHART, T.A.; ROBERT, N.; TRIGIANO, R.N.; STEWART JR., C.N. Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate Resistance. **Weed Science**, v. 8, p.109–117, 2010.

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

ZANATTA, T.S.C.; ZANATTA, J.F. Aplicações da Biotecnologia no estudo de Plantas daninhas. **Revista Científica da Faculdade de Balsas**, Ano III, v. 3, 2012.

ZHENG, Q.A.; TAI, C.K.; HU, J.Y.; LIN, H.Y.; ZHANG, R.H.; SU, F.C.; YANG, X.F. Satellite altimeter observations of nonlinear rossby eddy–kuroshio interaction at the Luzon Strait. **Journal of Oceanography** v. 67, p. 365–376, 2011.