

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

DÉBORA DA SILVA

Seleção de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para o estudo da diversidade genética em *Euphorbia heterophylla* L.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JULHO - 2014

DÉBORA DA SILVA

Seleção de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para o estudo da diversidade genética em *Euphorbia heterophylla* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete Aparecida Mangolim.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
JULHO - 2014

PÁGINA DESTINADA À FOLHA DE APROVAÇÃO. ENCONTRA-
SE NA SECRETARIA DO PGM

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente.

Henfil.

Aos meus pais, Salatiel Marcos da Silva e Izaura da Silva.

Ao meu marido, Adilio Malacarne.

Com gratidão, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre me guiar pelos melhores caminhos, concedendo-me a graça da sabedoria e permitindo que eu pudesse alcançar mais este trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela estrutura oferecida para a conclusão deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

À minha Orientadora, professora doutora Claudete Aparecida Mangolim, por aceitar me orientar, por toda dedicação, paciência e ajuda durante os experimentos, pela compreensão e conhecimentos transmitidos, permitindo grandes oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

Às Coorientadoras, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado e professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, por toda ajuda e dedicação.

Ao professor doutor Rubem Silvério de Oliveira Jr., por disponibilizar as sementes para elaboração deste trabalho.

Ao meu marido, Adilio Malacarne, pela ajuda nas coletas das sementes, pela compreensão, paciência e amor.

Aos professores do Laboratório 21 e 17, doutora Sandra Collet e doutor Erasmo Renesto, e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela valiosa contribuição em minha formação profissional.

Aos Secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro.

Aos Técnicos do Laboratório, Sérgio L. Calvi e Leila Frota.

Aos colegas dos Laboratórios 17 e 21, do Departamento de Biologia Celular e Genética da UEM, por toda ajuda e compreensão. Em especial, à minha grande amiga Ana Clara de Souza Meirelles, que tornou mais fácil minha caminhada.

Às minhas colegas de Laboratório, Tiara da Silva Coelho Bortolo e Tatiane Mantovão, que me deram os primeiros ensinamentos da parte laboratorial, e ao colega Raphael Augusto, que me ajudou nas extrações de DNA.

Aos estagiários do PIBIC, Giovana Marinelli, Milene Ormino, Afonso Pepinelli e Tauana Eisele, por toda ajuda.

Às minhas grandes amigas, Carla Tamy Yamamoto, Paula Gimenez Milani, Gleice Kelly Moreira Batista, Marcela Marinho, Priscila Toledo e Tais Valêncio, que sempre torceram pelo meu sucesso e me deram a certeza de que estavam ao meu lado.

A todos os amigos e familiares não citados, mas que também me apoiaram, torceram pela conclusão deste trabalho e são dignos de agradecimentos.

BIOGRAFIA

DÉBORA DA SILVA, filha de Salatiel Marcos da Silva e de Izaura da Silva, nasceu em 20 de abril de 1987, na cidade de São Pedro do Ivaí, estado do Paraná.

No ano de 2001, concluiu o Ensino Fundamental, na Escola Estadual Conjunto João de Barros, na cidade de Marialva, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Médio, no ano de 2004, no Colégio Estadual Pedro Viriato Parigot de Souza, também na cidade de Marialva, estado do Paraná.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em fevereiro de 2007, na Universidade Estadual de Maringá, Paraná. Durante o curso de Graduação, estagiou no Laboratório de Metabolismo Secundário de Plantas, por dois anos, sob a orientação do professor Dr. Osvaldo Ferraresi, e no Laboratório de Ensino, sob a supervisão do professor Dr. Paulo Inada, por um ano. Nos anos finais da Graduação, estagiou no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, sob a supervisão da professora doutora Claudete Aparecida Mangolim. Obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas em março de 2012.

Em março de 2012, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, estado do Paraná, desenvolvendo pesquisas sobre espécies vegetais de interesse econômico e realizando estudos com plantas daninhas (*Euphorbia heterophylla* L.).

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Plantas daninhas.....	4
2.2. Aspectos taxonômicos de <i>Euphorbia heterophylla</i>	6
2.3. Características morfológicas da espécie <i>Euphorbia heterophylla</i>	7
2.4. Importância econômica de <i>Euphorbia heterophylla</i>	12
2.5. <i>Euphorbia heterophylla</i> L. e a resistência a herbicidas	13
2.6. O uso de marcadores moleculares no estudo da diversidade genética de plantas daninhas e em <i>Euphorbia heterophylla</i>	17
2.7. O uso de marcadores ISSR (<i>Inter-Simple Sequence Repeats</i>) no estudo da diversidade genética de plantas daninhas	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Local de coleta das sementes de <i>Euphorbia heterophylla</i>	25
3.2. Germinação das sementes	26
3.3. Extração e quantificação do DNA de folhas de <i>Euphorbia heterophylla</i>	27
3.4. Amplificação e análise dos ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>).....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Perfil da amplificação dos segmentos de DNA entre os microssatélites (ISSR)	33
4.2. Estudo da diversidade e diferenciação genética de populações e sua estrutura genética	37
5. CONCLUSÕES	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

SILVA, Débora, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, julho de 2014. **Seleção de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para o estudo da diversidade genética em *Euphorbia heterophylla* L.** Orientadora: Claudete Aparecida Mangolim. Conselheiros: Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

A espécie *Euphorbia heterophylla* L. é popularmente conhecida no Brasil como amendoim-bravo ou leiteiro, sendo uma das plantas daninhas mais importante da cultura da soja e que afeta a produtividade de cerca de muitas culturas anuais e perenes em vários países. A importância do estudo dessa espécie se deve à sua frequente presença como invasora em culturas de grande importância econômica, como soja, milho e cana-de-açúcar. A avaliação da diversidade genética e o entendimento da estrutura de genética de populações são elementos importantes para identificar formas de manejo e para orientar o desenvolvimento de planos efetivos de controle das plantas daninhas. Frente à importância do controle desta daninha, o objetivo no presente estudo foi padronizar as reações e selecionar marcadores ISSR para avaliar a diversidade genética em 132 amostras de leiteiro, coletadas em oito regiões do Paraná, uma região do Rio Grande do Sul e uma de São Paulo, para verificar como estas populações estão geneticamente estruturadas. Dos 30 *primers* de ISSR avaliados, apenas nove amplificaram o DNA das 132 amostras de *E. heterophylla*. Em nível populacional, foi observada uma ampla diversidade genética. O polimorfismo médio nas sequências ISSR foi de 98,50%, sendo maior para as plantas da amostra coletada em Pato Branco II (87,97%) e menor para a população de Pato Branco I (33,83%), ambas coletadas no estado do Paraná. A diversidade genética de Nei (H_e) e o índice de Shannon variaram de 0,1335 a 0,3800 e de 0,1948 a 0,5462, respectivamente, indicando que as amostras de leiteiro analisadas são geneticamente divergentes. A diversidade total (H_t) avaliada para todas as plantas dos 10 locais de coletas foi 0,3611 e o nível de divergência genética (G_{ST}) foi alto (0,3607). Os valores altos para diversidade total e coeficiente de diferenciação representam a grande variação para alguns segmentos de ISSR, indicando que as amostras coletadas nas diferentes regiões formam amostras geneticamente divergentes.

A análise do polimorfismo realizada utilizando a estatística bayesiana indicou que as plantas das 10 localidades foram agrupadas em seis grupos ancestrais. Algumas amostras apresentaram predomínio de grupos de alelos e outras compartilham alelos de cinco ou de seis grupos, conferindo uma variância molecular alta dentro das amostras avaliadas. Este resultado também foi evidenciado pela análise da AMOVA, que indicou que 68% da variação genética total estão presentes dentro das amostras, enquanto a variação entre as amostras foi de 32%. O valor de identidade e similaridade genética estimado pelo método de agrupamento UPGMA mostrou que as amostras de Jandaia I e Jandaia II são as mais similares ($I = 0,9416$) e que as amostras de Pato Branco I e Pato Branco II são as mais divergentes ($I = 0,6915$). As amostras avaliadas formaram um grande grupo, não fazendo parte deste agrupamento somente a amostra de Pato Branco III. O intervalo dos valores de identidade genética estimados entre 0,6915 e 0,9416 indica ampla base genética para as 10 amostras de *E. heterophylla* coletadas. O resultado do agrupamento mostra que a divergência genética é independente da distância geográfica. Desta forma, as amostras de leiteiro analisadas no presente estudo, apresentando diversidade genética alta em nível molecular, podem ser de populações fundadoras que contêm marcadores ISSR diferenciados e formam populações geneticamente estruturadas. Os nove marcadores ISSR identificados no presente estudo poderão ser usados para monitorar efeitos de tipos e/ou doses diferentes de herbicidas sobre o genoma de leiteiro, como fatores determinantes ou não determinantes da estrutura de populações de *E. heterophylla*.

Palavras-chave: Marcadores ISSR; genética de populações; amendoim-bravo.

ABSTRACT

SILVA, Débora, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, July, 2014. **Selection ISSR markers (Inter Simple Sequence Repeat) for the study of genetic diversity in *Euphorbia heterophylla* L.** Adviser: Claudete Aparecida Mangolin. Committee Members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Maria Claudia C. R. Takasusuki.

The species *Euphorbia heterophylla* L., popularly known as milkweed (*amendoim-bravo* and *leiteiro* in Brazil), is one of the most important weeds in soybean culture and affects the productivity of many annual and perennial crops in several countries. Studies on the species are especially due to its frequent invading factor in economically important crops such as soybeans, corn and sugar cane. The assessment of genetic diversity and knowledge of population genetics structure are important factors to identify types of management and to guide the development of effective planning in weed control. Owing to the relevance of the weed control, current study standardized reactions and selected ISSR markers to assess the genetic diversity in 132 samples of *Euphorbia* harvested in eight regions of the state of Paraná, Brazil, and a single region of the state of Rio Grande do Sul, and of the state of São Paulo, Brazil, to investigate how these populations were genetically structured. In a total of 132 samples of *E. heterophylla*, thirty ISSR primers were evaluated and only nine had their DNA amplified. A wide genetic diversity was reported at population level; average polymorphic ISSR sequences was 98.50%, with highest rates in plants collected in Pato Branco II (87.97%) and with lowest rates in plants collected in Pato Branco I (33.83%), both in the state of Paraná. Ney's genetic diversity (H_e) and Shannon's index ranged between 0.1335 and 0.3800 and between 0.1948 and 0.5462, respectively. The above showed that the samples of milkweed analyzed are genetically divergent. Total diversity (H_t) for all plants collected from 10 sites was 0.3611, whilst the level of genetic divergence (G_{ST}) was high (0.3607). Since high total diversity and differentiation coefficient rates demonstrated the great variation for some ISSR segments, this fact indicated that the samples collected in different regions comprised genetically divergent samples. Polymorphism analysis with Bayesian statistics

indicated that plants from the 10 localities were grouped into six ancestral groups. Some samples showed a predominance of groups of alleles and other shared alleles with five or six groups. The above provided a high molecular variance within the samples evaluated. The same result was also given by the AMOVA analysis, which indicated that 68% of the total genetic variation occurred in the samples, whereas the variation between samples reached 32%. The identity and genetic similarity rates estimated by the UPGMA grouping method showed that samples Jandaia I and Jandaia II were the most similar ($I = 0.9416$), and the samples of Pato Branco I and Pato Branco III were the most divergent ($I = 0.6915$). The samples evaluated formed a large group, with the exception of sample from Pato Branco III. The estimated genetic identity rates ranged between 0.6915 and 0.9416, and indicated a broad genetic base for the ten *E. heterophylla* samples collected. Results show that genetic divergence is independent of geographic distance. Consequently, samples of milkweed analyzed in current study with high genetic diversity at the molecular level may be founder populations containing different ISSR markers and forming genetically structured populations. The nine ISSR markers identified in current analysis may be used to monitor effects of types and / or different doses of herbicides on the milkweed genome and as determinant or non-determinant factors of *E. heterophylla* population structure.

Keywords: ISSR markers; population genetics; wild poinsettia.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Euphorbia heterophylla* L. é conhecida popularmente como leiteiro ou amendoim-bravo e seu centro de origem é a região Brasil-Paraguai. Trata-se de uma planta daninha bastante frequente no Sul, no Sudeste e no Centro-Oeste do Brasil (Kissmann e Groth, 1992). Seu controle químico é realizado principalmente com herbicidas que agem inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS). Segundo Vidal e Winkler (2002), foram observados genótipos resistentes em diversas lavouras da região Sul. Em levantamento realizado no planalto do Rio Grande do Sul, foi constatado que 74% das áreas de soja apresentavam-se infestadas com esta espécie (Vidal e Winkler, 2002). Segundo Vasconcelos et al. (2000), o controle desta planta daninha é muito importante, pois afeta a produtividade de muitas culturas em diversos países. A importância agrícola dessa planta se deve à sua frequente presença como invasora em culturas de grande importância econômica, como soja, milho e cana-de-açúcar, tanto em plantio direto quanto convencional.

E. heterophylla possui uma grande variação fenotípica, que se dá principalmente em relação ao formato e tamanho das folhas, podendo apresentar variações de uma população para outra, dentro da mesma população, entre descendentes de uma mesma planta e até mesmo em uma única planta (Kissmann e Groth, 1992; Holm et al., 1997).

A classificação de *E. heterophylla* ainda não está bem definida. A variabilidade no formato das folhas sugere que a espécie ainda esteja em evolução e, segundo Holm et al. (1997), estas características têm sido utilizada para sugerir que ela seria, de fato, formada por diferentes espécies. A grande variabilidade morfológica pode ser um reflexo da variabilidade genética em nível molecular e uma forma de avaliar esta diversidade é estudar diferentes populações, utilizando diferentes classes de marcadores moleculares (Kissmann e Groth, 1992).

Os marcadores moleculares de DNA são sequências genômicas localizadas em determinados locos e definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo molecular (Zietkiewicz et al., 1994). Após o surgimento das técnicas de Biologia Molecular, na década de 80,

surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente em nível de DNA. São várias as classes de marcadores moleculares. Dentre elas, os marcadores moleculares ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), que representam uma classe recente, desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (Zietkiewicz et al., 1994). Esses marcadores ISSR são bastante variáveis, fornecem grande número de dados, são facilmente detectados usando poucos equipamentos e ainda representam um custo razoável para o pesquisador (Wolfe, 2005).

O princípio da técnica é baseado em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e envolve amplificações de segmentos de DNA presente numa região de distância amplificável entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas e orientadas em direções opostas. As amplificações não requerem informações da sequência do genoma e o resultado avalia multilocos com alto padrão de polimorfismo. ISSR é uma técnica simples, rápida e eficiente. Seus produtos são amplificáveis de 200 a 2000 pb (pares de bases) de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade, possivelmente devido ao uso de *primers* longos e um subsequente uso de alta temperatura de anelamento (Bornet e Branchard, 2001; Redy et al., 2002).

Devido à sua abundância e dispersão no genoma, os marcadores ISSR têm sido utilizados para estudar relações entre duas populações muito relacionadas e também para estimar a extensão da diversidade genética em nível inter e intraespecífico em uma ampla variedade de espécies. Também têm sido usados em estudos de *fingerprinting*, em seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético (Redy et al., 2002).

O objetivo no presente estudo foi selecionar marcadores ISSR para avaliar a diversidade genética, em nível molecular, em amostras de leiteiro coletadas em diferentes regiões do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, para verificar como estas populações estão geneticamente estruturadas. Na literatura especializada não há registros de marcadores ISSR usados para estudar a espécie *E. heterophylla*. Os marcadores ISSR poderão ser úteis para monitorar, em nível molecular, a diversidade ou a estabilidade genética das plantas de leiteiro e a forma como as populações estão geneticamente

estruturadas pode ser uma informação importante para nortear o manejo e o controle de infestação desta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas daninhas

Segundo Brighenti e Oliveira (2011), o conceito de plantas daninhas é baseado em seu aspecto indesejável pelo homem. Por isso, uma maneira mais ampla de conceituá-la é como toda e qualquer planta que ocorre em local não desejável. Segundo esses autores, as plantas daninhas apresentam rusticidade, são resistentes a pragas e doenças e geralmente produzem um grande número de sementes viáveis, com adaptações que auxiliam na dispersão da espécie e formas variadas de multiplicação (tubérculos, estolões, rizomas e bulbos).

Lorenzi (2000) relatou que a história das plantas daninhas remonta a época em que nossas plantas cultivadas viviam em estado silvestre. O homem foi, ao longo do tempo, melhorando as espécies de seu interesse, retirando gradativamente a capacidade destas sobreviverem sem os seus cuidados.

Geralmente, estas plantas silvestres possuem alterações fisiológicas para o melhor aproveitamento dos nutrientes do solo, água, luz e gás carbônico e ainda conseguem acumular maiores quantidades de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio em seus tecidos do que as plantas cultivadas. Com as mudanças nas práticas culturais, as espécies de plantas daninhas menos adaptadas a estas práticas tendem a diminuir ou desaparecer enquanto as espécies mais adaptadas passam a dominar a área (Radosevich et al., 1997).

Ruedell (1995) salientou que as plantas daninhas também podem apresentar aspectos positivos, como a proteção do solo contra a erosão, e que o fornecimento de cobertura de solo é importante no sistema de semeadura direta. A cobertura morta fornecida pelas plantas daninhas sobre o solo, após o seu controle, é importante, pois reduz o aquecimento da superfície e auxilia na retenção da umidade. Quando esta matéria orgânica é degradada, incrementa os teores de matéria orgânica e de nutrientes do solo. Pode também interferir na germinação de sementes de outras plantas daninhas, tanto pelo sombreamento do solo quanto inibindo a germinação e desenvolvimento pela liberação de substâncias químicas que apresentam efeito alelopático.

Segundo Ruedell (1995), as plantas daninhas podem interferir na saúde e nas atividades humanas. Elas podem afetar a saúde quando são ingeridas por crianças e adultos, podem causar dermatites e alergias, quando se tem contato ou quando existe a exposição com o pólen de algumas espécies. Além de problemas de visibilidade em rodovias e ferrovias, de tirar a beleza e diminuir a utilização de logradouros públicos, estas plantas também podem reduzir o valor da terra em função do seu difícil controle e até mesmo inviabilizar o cultivo agrícola e formação de pastagens.

Segundo Lorenzi (1991), as plantas daninhas são responsáveis por 30 a 40% das perdas agrícolas no mundo.

Brighenti e Oliveira (2011) também ressaltaram que as plantas daninhas apresentam características que proporcionam a sua sobrevivência em ambientes sujeitos a grandes limitações, pois estas plantas apresentam alta capacidade na obtenção de recursos ambientais, como nutrientes, luz, água e CO₂. Apresentam boa capacidade de propagação, tanto por via de sementes como de forma vegetativa, e a maioria das espécies de plantas daninhas apresenta um grande número de descendentes.

A propagação de sementes ou propágulos é realizada por diferentes métodos de dispersão e levados para grandes distâncias da planta mãe, mecanismos estes que aumentam a dificuldade no controle das plantas daninhas. A espécie *Euphorbia heterophylla*, por exemplo, lança as suas sementes a distâncias que variam de dois a cinco metros da planta mãe. Esta espécie, com seu metabolismo fotossintético C₄, assim como várias outras espécies de plantas daninhas, é mais eficiente quanto ao uso de CO₂ e possui maior capacidade para retirar do meio ambiente os elementos necessários para o seu crescimento e desenvolvimento (Brighenti e Oliveira, 2011).

Quanto ao ciclo de vida, as plantas daninhas podem ser perenes, anuais ou bianuais. As espécies perenes possuem ciclo de vida superior a 24 meses, podem se reproduzir por sementes e/ou órgãos vegetativos e são bastante frágeis, embora possam se regenerar com facilidade. A maioria das espécies daninhas presentes no Brasil é anual, completando o seu ciclo em um período inferior a 12 meses. Podem florescer e frutificar, precocemente, em condições de seca e muitas espécies apresentam mais de um ciclo reprodutivo dentro do mesmo ano. As plantas daninhas bianuais possuem ciclo de vida

superior a 12 meses e inferior a 24 meses. Geralmente, germinam na primavera e no verão do primeiro ano e morrem ao frutificarem no outono do próximo ano (Deuber, 1992)

O controle das plantas daninhas é extremamente importante para o manejo das culturas, refletindo diretamente no rendimento e nos custos de produção. Segundo Radosevich et al. (1997), é possível encontrar vários métodos de controle, mas os métodos mais usados incluem o biológico, o químico, o cultural e o físico.

O uso de herbicidas tem sido a prática mais comum de controle de *E. heterophylla* e, em função da pressão de seleção imposta pelo uso repetido destes, na última década, foram identificados biótipos desta planta daninha resistentes aos inibidores de ALS (Gazziero et al., 1998; Vidal e Winkler, 2002; Heap, 2014).

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 grande diversidade genética, a qual favorece a seleção de indivíduos resistentes aos herbicidas em virtude da maior probabilidade de se encontrar, na população, alelo que confere resistência ao produto utilizado. Pelo mesmo motivo, grandes infestações favorecem o aumento dos riscos de seleção para resistência (Vidal e Merotto Júnior, 2001; Winkler et al., 2002).

2.2. Aspectos taxonômicos de *Euphorbia heterophylla*

Euphorbia heterophylla, família Euphorbiaceae, é nativa das regiões tropicais e subtropicais das Américas (Kissmann e Groth, 1997; Barreto e Evans, 1998). É considerada uma planta invasora de várias culturas, como soja, milho, arroz, banana (Kissmann e Groth, 1997; Lorenzi, 2000), feijão (Cobucci et al., 1999) e amendoim (Willard e Griffin, 1993). Sua dispersão vai desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil (Costa, 1982) e há registros da espécie também em regiões desérticas dos Emirados Árabes Unidos e no Marrocos (Suda, 2001).

No Brasil, *E. heterophylla* é popularmente conhecida como amendoim-bravo, leiteira (Suda, 2001), leiteiro, parece-mas-não-é, flor-de-poeta, adeus-

brasil, mata-brasil, café-do-bispo e café-do-diabo (Lorenzi, 2000). Vários autores descreveram sinônimas para esta espécie, tais como *E. prunifolia*, *E. geniculata*, *Poinsettia heterophylla* (Allem, 1975), *P. geniculata* (Wilson, 1981), *E. zonosperma* (Allem, 1975), *E. elliptica*, *E. frangulaefolia* (Bacchi, 1984), *E. epilobiifolia*, *E. morisoniana*, *E. taiwaniana* e *P. ruiziana* (Lorenzi, 2000). Barreto e Evans (1998) relataram que as sinônimas *E. geniculata* e *E. prunifolia* são bastante utilizadas na literatura.

Os diferentes nomes dados à espécie expressam a grande variação encontrada nas folhas das plantas, principalmente em relação ao formato e tamanho (Holm et al., 1997). Essa variabilidade morfológica é observada em indivíduos de diferentes populações, dentro de uma mesma população e até mesmo em uma única planta (Kissmann e Groth, 1997; Vasconcelos et al., 2000). Os diferentes formatos do limbo das folhas indicam uma enorme diversidade fenotípica, o que dificulta os estudos taxonômicos, causando, muitas vezes, controvérsias quanto à definição das características e à classificação botânica da espécie (Kissmann e Groth, 1997). A espécie *E. heterophylla* pertence à família Euphorbiaceae e esta família apresenta cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7500 espécies distribuídas em todo o mundo. Esta espécie foi classificada por Linneau, em 1753, como pertencente ao Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Malpighiales, Família Euphorbiaceae, Subfamília Euphorbioideae, Tribo Euphorbieae, Subtribo Euphorbiinae, Gênero Euphorbia.

2.3. Características morfológicas da espécie *Euphorbia heterophylla*

As plantas da *Euphorbia heterophylla* podem apresentar-se como arbustos, subarbustos e ervas e a maioria dos representantes é herbácea. O amendoim-bravo (*E. heterophylla*) é uma planta daninha herbácea, ereta, com 40-60 cm de altura (Vargas et al., 2001). Este gênero caracteriza-se também pela produção de uma substância leitosa esbranquiçada de propriedades tóxicas (látex) (Joly, 1998) e que apresenta substâncias carcinogênicas (Biesboer e Mahlberg, 1981). O látex pode ser observado tanto nas partes florais quanto nas partes vegetativas (Cronquist, 1981). Caracteriza-se também pela alta capacidade competitiva por recursos, como água, luz e nutrientes,

ocasionando redução da qualidade e produtividade de grãos na cultura infestada por *E. heterophylla* (Carvalho et al., 2010).

A espécie *E. heterophylla* apresenta caule simples ou ramificado; suas folhas são alternas, opostas ou verticiladas, ocorrendo tanto no caule como nos ramos. Há grande variabilidade de forma e tamanho das folhas (Kissmann e Groth, 1992; Holm et al., 1997), que são verdes, sendo que as superiores apresentam disposição semi-opostas ou opostas. Quanto ao formato, podem ser lanceoladas, ovaladas, elípticas ou panduradas (Costa, 1982; Suda, 2001). O bordo é serrilhado e a presença de tricomas nas superfícies inferior e superior é rara, podendo estar restrita ao bordo. Na base das folhas, ocorrem estípulas glanduliformes (Costa, 1982). O hábito de crescimento e a ramificação são bastante influenciados pela luminosidade (Kissmann e Groth, 1997).

Na axila das duas últimas folhas, desenvolve-se uma ramificação dicotômica, onde são formadas inflorescências principais chamadas ciátio. Cerca de 30 a 40 flores masculinas dispõem-se ao redor de uma única flor feminina (Cronquist, 1981; Costa, 1982; Kissmann e Groth, 1997). A flor do leiteiro, portanto, é uma estrutura bissexual, que difere das demais Euphorbiaceae pela presença de uma inflorescência característica, chamada ciátio (Cronquist, 1981) (Figura 1).

Os conjuntos de ciátios desenvolvem-se na inflorescência que está localizada na parte terminal do caule e dos ramos do leiteiro. Os ciátios são involúncros obovóides, com cerca de 2,5 mm de comprimento, formados por brácteas fusionadas, abertos na parte superior. Cada ciátio abriga 30 a 40 flores masculinas e apenas uma feminina, constituída pelo ovário, coroado por estiletos fendidos até a metade e apoiada sobre grosso pedicelo que, após a fecundação, se alonga, posicionando o fruto de forma pendente ao lado do involúncro. A flor masculina é formada por um estame, articulado no pedicelo e os estames circundam a flor feminina (Kissmann e Groth, 1992).

No Quadro 1, está apresentada uma breve descrição de morfologia foliar de amostras de *E. heterophylla* estudadas por Vasconcelos et al. (2000).

Quadro 1 - Identificação e descrição de 11 aspectos morfológicos de amostras de folhas de *Euphorbia heterophylla* realizada por Vasconcelos et al. (2000)

Número	Breve descrição de morfologia foliar de amostras de <i>Euphorbia heterophylla</i> estudadas por Vasconcelos et al. (2000)
1	Folhas arredondadas e bordas lisas, caule glabro, quase branco e com ramificações normais a 5 cm do solo.
2	Folhas finas, estreitas e estreito-lobadas, apresentando caule piloso e arroxeadado, com ramificações densas a 1 cm do solo.
3	Folhas lobadas, estreito-lobadas e estreitas, apresentando caule piloso quase branco e ramificações densas, começando abaixo do nível do solo.
4	Folhas estreitas e estreito-lobadas, apresentando caule glabro e arroxeadado, com ramificações densas saindo no nível do solo.
5	Folhas lobadas e serrilhadas, apresentando caule glabro quase branco com ramificações normais saindo no nível do solo.
6	Folhas estreitas, caule piloso e branco, com ramificações densas abaixo do nível do solo.
7	Folhas arredondadas e serrilhadas, caule glabro quase branco, com ramificações normais abaixo do nível do solo.
8	Folhas estreitas (planta mãe).
9	Folhas mais largas (broto).
10	Folhas grandes e lobadas, apresentando as folhas da inflorescência arredondadas, caule grosso com pouca pilosidade e roxo, sem ramificações.
11	Folhas lobadas com caule glabro quase branco, com ramificações densas abaixo do nível do solo.

A reprodução é realizada exclusivamente por sementes e pode ocorrer tanto por autofecundação como por fecundação cruzada (Cronquist, 1981; Barroso, 1991). Após a fecundação, o pedicelo se alonga, tornando o fruto pendente para fora do receptáculo. O fruto é capsular e trilobular, com uma semente por lóculo (Suda, 2001). Com o amadurecimento, ocorre alteração da coloração do fruto (Barroso, 1991) e a cápsula se rompe, explosivamente, lançando as sementes para locais distantes da planta-mãe (Suda, 2001). A maturação dos frutos numa só planta não ocorre simultaneamente, o que possibilita a produção de sementes por um longo período (Costa, 1982; Kissmann e Groth, 1997). Cada planta produz grande quantidade de sementes

(Suda, 2001), aumentando seu potencial de competição com outras espécies vegetais (Costa, 1982). O ciclo de *E. heterophylla* é curto, de 2 a 3 meses, sendo possíveis duas a três gerações em um ano e esta espécie se desenvolve bem em quase todos os tipos de solo, preferindo, no entanto, os férteis e bem drenados (Kissmann e Groth, 1992).



Figura 01 - Conjuntos de cíatios organizados na inflorescência que está localizada na parte terminal do caule e dos ramos de *Euphorbia heterophylla*.
Fonte: [http: www.webportalagropecuario.com](http://www.webportalagropecuario.com).

A semente é ovóide com tegumento áspero de coloração variável, com fundo marrom-claro e quase negro e apresentam na superfície pequenas protuberâncias verruciformes (células mucilaginosas). Apresentam dois cotilédones e testa escura, sendo produzidas em grande quantidade (Cronquist, 1981; Barroso, 1984; Kissmann e Groth, 1992). Podem apresentar dormência ou não e tendem a conservar o poder germinativo por muitos anos, podendo passar intactas pelo trato digestivo de animais, como as aves (Lorenzi, 2000) (Figura 2).

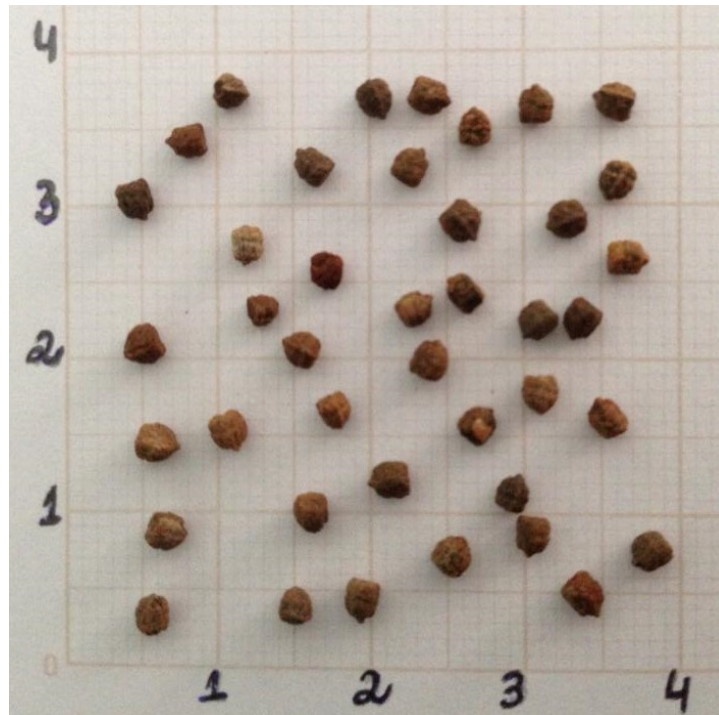


Figura 2 - Formato e características das sementes de *Euphorbia heterophylla*.

A causa da dormência não é conhecida, mas a luz, aliada a temperaturas alternadas de 25 a 35 °C estimula a germinação (Kissmann e Groth, 1992). As sementes obtidas na primavera não necessitam de luz para germinar, mas quando as sementes são produzidas no inverno, outono ou verão, a germinação é promovida pela luz (Suda e Pereira, 1997). Sob condições de alternância de temperatura (25 e 35 °C), as sementes não necessitam de luz para germinar e as porcentagens de germinação são próximas de 100% (Suda, 1991). No Brasil, as sementes recém-colhidas nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul não apresentaram dormência (Suda e Pereira, 1997), ao contrário do ocorrido nos Estados Unidos (Bannon et al., 1978). A dormência pode estar relacionada à presença de substâncias insolúveis em água, pois Suda e Giorgini (2000) analisaram a composição e a mobilização de reservas presentes nas sementes de *E. heterophylla* e verificaram que os lipídios constituem em torno de 59% da massa seca das sementes, sendo o principal material de reserva.

Segundo Kissmann e Groth (1992), as sementes germinam facilmente a uma profundidade de 4 cm e nas lavouras de soja do Rio Grande do Sul e do Paraná apresentam germinação escalonada. A possibilidade de sementes de *E. heterophylla* germinarem em diversas condições ambientais pode ser a causa da sua ampla distribuição geográfica (Suda, 2001).

2.4. Importância econômica de *Euphorbia heterophylla*

As plantas da espécie *E. heterophylla* são consideradas de grande importância econômica porque afetam a produtividade de cerca de 31 culturas anuais e perenes em 56 países. Além de estarem distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano (Wilson, 1981), elas foram descritas também em muitos países da África e Ásia e se encontram amplamente distribuídas no centro-sul do Brasil, apresentando seu centro de origem na região Brasil-Paraguai (Kissmann e Groth, 1992).

Os danos causados pelo leiteiro foram descritos para culturas de amendoim e de soja (Moore et al., 1990; Bridges et al., 1992; Willard e Griffin, 1993). No caso das culturas de soja e amendoim, as perdas chegam a 50% (Willard e Griffin, 1993; Costa, 1982). Na cultura de soja, além de promover perdas por competição, o leiteiro também interfere na eficiência da colheita e qualidade das sementes colhidas, pois acarreta aumento do teor de umidade dos grãos (Pinto e Panizzi, 1994).

No Rio Grande do Sul, a espécie *E. heterophylla* foi descrita como uma das principais plantas invasoras da cultura de soja, ocorrendo, também, nos Estados de Santa Catarina e Paraná (Gazziero, 1980). Esta espécie apresenta crescimento rápido, podendo formar uma densa cobertura sobre as plantas cultivadas (Wilson, 1981; Kissmann e Groth, 1997). Estudos realizados no Planalto do Rio Grande do Sul constataram que 74% das áreas de soja se apresentavam infestadas com essa espécie (Vidal e Winkler, 2002). Em lavouras de soja, densidades de 10 plantas de *E. heterophylla*/m² reduzem 7% do rendimento de grãos quando as duas plantas, soja e leiteiro, estão no mesmo ciclo de desenvolvimento (Winkler et al., 2003) e quando o período de Fleck, 1982).

Estudos realizados por Holm et al. (1997) apontam que a densidade de 75 plantas/m² de leiteiro reduziu o rendimento em 12% e densidades de 300 e 600 plantas/m² acarretaram perdas de rendimento de 23 e 33%, respectivamente. No Sul dos Estados Unidos, essa invasora também tem acarretado perdas, 8 plantas/m² de *E. heterophylla*, competindo com a soja por 8 e 12 semanas e, durante todo o ciclo da cultura, reduziu a produção em 19,21 e 33%, respectivamente. Estes autores descreveram, ainda, que densidade de 50 plantas/m² frequentemente resulta em perdas totais das lavouras de soja.

Além das perdas por competição, *E. heterophylla* é considerada uma planta tóxica e hospedeira alternativa para o percevejo marrom, *Euschistus heros*, um inseto extremamente danoso à soja (Pinto e Panizzi, 1994). A espécie também é considerada hospedeira adicional e reservatório do fungo *Diaporthe phaseolorum*, causador do cancro da haste da soja (Garrido e Dhingra, 1997).

Alguns autores descreveram propriedades industriais e farmacológicas para *E. heterophylla*. O óleo presente na semente apresenta utilidades industriais, como óleo secante e matéria-prima na elaboração de tinta e verniz, além de apresentar potencial medicinal (Silva e Salatino, 1999). Na Nigéria, suas folhas são utilizadas como purgativo, cuja ação farmacológica foi comprovada por Akubue et al. (1983). Neste mesmo país, Enemaduku et al. (2011), em análise do extrato etanólico de diferentes partes desta planta, menos o de raiz, identificaram atividade contra agentes tifóides, provavelmente exercida pela presença dos compostos detaninos e antraquinonas. Segundo Holm et al. (1997), o látex também tem sido utilizado para tratamentos localizados de erisipela.

2.5. *Euphorbia heterophylla* L. e a resistência a herbicidas

E. heterophylla é um problema agrícola de longa data, o que ocorre em função das alterações de práticas de cultivo, especialmente o uso de controle químico (Deuber, 1992; Fornarolli et al., 2002). Embora o manejo de plantas daninhas possa ser efetuado por diversos métodos (Deuber, 1992; Burnside, 1992), a espécie *E. heterophylla* foi considerada de difícil controle porque, para

evitar perdas de produtividade nas culturas infestadas, foram necessárias repetidas aplicações de herbicidas, bem como combinações de vários herbicidas (Willard e Griffin, 1993).

Foi postulado que o uso constante de um herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação pode exercer alta pressão de seleção, reduzindo as populações suscetíveis e selecionando biótipos resistentes e que já existiam nas populações, mas em baixa frequência (Ponchio, 1997; Mattiolo et al., 1999). A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é, por definição, a ocorrência de biótipos com potencial herdado para sobreviver aos herbicidas eficazes no controle da espécie. Sua ocorrência foi teorizada por Harper (1956) e documentada pela primeira vez em 1957 (Hilton, 1957; Switzer, 1957). A partir de 1996, os casos de resistência têm sido documentados no Brasil, sendo registrada, em média, uma nova espécie de planta resistente a cada ano (Winkler e Vidal, 2002).

A resistência, principalmente a múltipla, dificulta ou pode inviabilizar o controle químico desta espécie, devido à falta de herbicidas disponíveis para o seu controle. Os mecanismos que determinam a resistência de plantas daninhas a herbicidas estão relacionados, principalmente, aos processos de absorção e/ou translocação dos herbicidas, ao local de ação alterado, ou mesmo ao processo de metabolização dos herbicidas pelas plantas (Vidal, 1997). Estudos com biótipo de leiteiro com resistência apenas a inibidores da ALS, em que foi isolada essa enzima, constataram atividade enzimática muito menor em relação à do biótipo suscetível, o que indica que a resistência é causada por alteração no local de ação da enzima ALS (Brighenti e Oliveira, 2011).

O controle de *E. heterophylla* é realizado por herbicidas inibidores das enzimas acetolactato sintase (ALS) e protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (Vidal e Merotto JR, 2001). A enzima ALS, também chamada de acetohidroxido ácido sintase (AHAS), é a primeira enzima a agir na rota de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Os herbicidas que atuam nessa enzima se distribuem em cinco grupos químicos: imidazolinonas, sulfoniluréias, sulfonanilidas, pirimidiniloxibenzoatos e sulfonilamino carboniltriazolinonas (Vidal e Merotto JR, 2001).

No final da década de 1970, a *E. heterophylla* foi expressivamente selecionada pelo uso dos herbicidas metribuzin e trifluralin, aplicados em pré-semeadura da soja, na sucessão soja/milho nos Estados do Sul do Brasil (Pitelli, 1992). Contudo, na última década, identificaram-se, em leiteiro, biótipos resistentes aos inibidores de ALS, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul e no Paraguai (Vidal e Merotto Júnior, 2001; Trezzi et al., 2005; Heap, 2014). Também foram identificados biótipos com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX detectados no Sudoeste do Paraná.

Provavelmente, a resistência ocorreu em um sistema em cascata (Trezzi et al., 2005). Inicialmente, houve uma alta pressão de seleção causada pelos inibidores de ALS e, em seguida, pelos inibidores de protox, o que resultou na seleção de resistência a ambos os mecanismos de ação, em momentos distintos, na mesma população. No entanto, estes biótipos ainda não tiveram seu mecanismo de resistência totalmente explicado. A medida da atividade de ALS de biótipos resistentes e suscetíveis, em resposta ao aumento dos níveis de imazapyr e imazethapyr, evidencia que a resistência do biótipo de *E. heterophylla* a herbicidas inibidores da ALS é provavelmente devido exclusivamente à insensibilidade do ALS aos herbicidas (Vargas, 2001). Segundo Vidal et al., (2007). Há também relatos de resistência ao glifosato.

O primeiro caso de biótipos de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da ALS no Brasil foi relatado por Vidal e Fleck (1997). Estes autores analisaram uma população proveniente da região das Missões, Rio Grande do Sul, onde herbicidas do grupo das imidazolinonas eram utilizados há mais de cinco anos no controle de *E. heterophylla*. Posteriormente, ainda na década de 1990, foram encontrados biótipos de leiteiro também resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) (Gazziero et al., 1998a).

A resistência aos inibidores de ALS em *E. heterophylla* é condicionada por um único gene dominante e com herança nuclear (Vargas et al., 1999).

A premissa é de que a probabilidade de selecionar biótipos de *E. heterophylla* com resistência múltipla aumenta na mesma ordem de magnitude em que ocorre o uso de outros herbicidas que apresentam um mesmo mecanismo de ação. Estudos realizados por Trezzi et al. (2005) confirmam que, nos estados do Paraná e Santa Catarina, existem biótipos de *E.*

heterophylla resistentes a herbicidas com os dois mecanismos de ação, isto é, resistência múltipla a vários herbicidas inibidores de ALS e de PROTOX.

Outra premissa apresentada é de que a seleção de biótipos resistentes é favorecida por características inerentes às plantas daninhas, como a grande diversidade genética, favorecendo a seleção de indivíduos resistentes aos herbicidas devido à maior probabilidade de se encontrar alelos que oferecem resistência ao produto utilizado (Winkler et al., 2003). Estudos mostraram que as práticas agronômicas adotadas, como a monocultura da soja e a utilização frequente e intensa de herbicidas, aumentaram a pressão de seleção de biótipos resistentes nesses sistemas de cultivo (Owen, 2001).

Várias pesquisas indicaram, de acordo com Vidal (1997), fatores importantes a serem considerados em relação às características das plantas daninhas, dos herbicidas e das práticas culturais, que podem contribuir para a rápida ocorrência de resistência a determinados herbicidas. Para as plantas daninhas, foram citados: hábito de crescimento anual, elevada capacidade de produção de sementes, alta porcentagem de produção de sementes, alta porcentagem de sementes viáveis (baixa dormência), produção de várias gerações a cada ano e sensibilidade a determinado herbicida.

As características relacionadas aos herbicidas incluem: atuação em um único mecanismo de ação, elevada eficiência sobre determinada espécie daninha (causando alta pressão de seleção), uso de doses superiores às necessárias para alcançar controle das plantas daninhas e uso frequente em aplicações sequenciais. Dentre os fatores importantes a serem considerados em relação às práticas culturais e que podem contribuir para a rápida ocorrência de resistência a determinados herbicidas incluem: o monocultivo, a não eliminação das plantas daninhas que escapam ao controle por herbicidas e o uso contínuo de um único ou de poucos herbicidas que apresentam o mesmo modo de ação (Vidal, 1997).

Relatos de Ferreira (2003) registram que as folhas do leiteiro apresentam barreiras à penetração de agroquímicos. Estas barreiras incluem o alto teor de cera epicuticular, a elevada densidade de laticíferos e a grande espessura da cutícula da face adaxial. Outro fator que influencia na eficiência da ação dos herbicidas é o teor de umidade do solo. Resultados de campo e de casa de vegetação indicaram que herbicidas aplicados sobre a folhagem

durante períodos de seca são menos efetivos quando comparados com aplicações realizadas em solo com umidade adequada (Boydston,1990; Perego et al., 1990). Segundo Basler et al. (1961) e Levene e Owen (1995), a baixa eficiência dos herbicidas aplicados durante períodos de déficit hídrico deve-se, principalmente, à redução na absorção desses compostos.

Ambas as espécies, soja e leiteiro, de acordo com Winkler et al. (2003), teriam evoluído nos últimos anos em um processo paralelo, favorecendo a seleção de biótipos resistentes aos herbicidas inibidores de ALS em campos de soja, em função do uso intenso de produtos com este mecanismo.

2.6. O uso de marcadores moleculares no estudo da diversidade genética de plantas daninhas e em *Euphorbia heterophylla*

Desde o final da década de 90 do século passado, os marcadores moleculares têm sido usados em grande escala para detectar a variabilidade genética em plantas, pois são ferramentas importantes e que possibilitam acompanhar as características focadas pelo melhoramento genético (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Até a década de 60, os estudos de polimorfismos nas populações baseavam-se em avaliações de diferentes fenótipos morfológicos. Entretanto, o pequeno número de parâmetros fenotípicos morfológicos disponíveis, classificava as populações como geneticamente homogêneas (Futuyma, 1992).

Após surgirem as técnicas modernas da biologia molecular, foram elaborados diversos métodos de detecção de polimorfismo genético no DNA. Inicialmente, foi desenvolvida a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que utiliza enzimas de restrição e sondas de DNA para hibridização. Este marcador foi amplamente utilizado para diversos tipos de estudos, inclusive estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A primeira metade da década de 80 assistiu ao desenvolvimento de um método de amplificação de sequência de DNA que revolucionou a análise genética nestes últimos anos: a reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Saiki et al., 1988). A técnica de PCR baseia-se na capacidade da enzima *taqDNA polimerase* replicar sequências de DNA em certas condições laboratoriais, a partir de um par de pequenos fragmentos

iniciadores da fita molde (*primers*), que flanqueiam a sequência que se deseja amplificar. Por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura, ocorre a desnaturação, o anelamento e a extensão de uma determinada sequência de DNA que é amplificada, ciclo após ciclo, em progressão geométrica. Isso torna possível, após a sua separação por eletroforese, sua visualização em gel na forma de uma banda, (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O emprego das técnicas estabelecidas permitiu o desenvolvimento de diferentes classes de marcadores como: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), microssatélites ou SSRs (*Simple Sequences Repeat*) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), que podem ser empregados em vários tipos de estudos como, por exemplo, a estrutura de população, sistemática e relações evolutivas entre organismos. Estes marcadores foram utilizados como importantes ferramentas para solucionar problemas de genética ecológica associados com plantas daninhas (O'Hanlon et al., 1999).

O interesse no uso de marcadores moleculares foi importante devido ao fato destes poderem ser empregados para quantificar a variabilidade genética, descrever como esta se distribui entre e dentro de populações e para indicar ou sugerir como esta variabilidade pode ser manipulada (Robinson, 1998). A variabilidade contida na amostra a ser analisada dependerá do polimorfismo e da estrutura genética presente nesta população (Machado, 1982). O uso de marcadores moleculares tem sido bastante empregado desde o início do ano 2000 nos estudos de variabilidade, sendo capaz de detectar numerosos polimorfismos (Waldschmidt et al., 2002).

O estudo da variabilidade genética de populações de plantas daninhas pode ser de grande importância para o manejo, principalmente porque esta variabilidade pode interferir na eficiência de vários métodos de controle. Os principais métodos usados para o manejo de plantas daninhas incluem o biológico, o químico, o cultural e o físico (Radosevich et al., 1997) e o sucesso dos programas de manejo de plantas daninhas está associado à variabilidade genética. Com relação ao baixo nível de variabilidade, muitas plantas daninhas exóticas colonizam muito bem novas áreas. A variação genética de plantas daninhas é, em geral, avaliada em locos neutros, mas estes não indicam necessariamente o nível de variação para todos os locos que governam o

fitness (National Research Council, 2002). Entretanto, se espécies de plantas daninhas possuem alto *fitness* e grande potencial de colonização, elas persistirão (Barret, 1988). Apenas cerca de 1% de todas as espécies de plantas introduzidas tornam-se invasoras (National Research Council, 2002).

Estudos empregando isozimas (Barret, 1992), RAPD e AFLP (Okuno et al., 1998; Pester et al., 2003) têm evidenciado que muitas populações de plantas daninhas contêm baixa diversidade genética e que a estimativa da diversidade é idêntica tanto quando avaliada por meio de isozimas como quando avaliada com DNA. De acordo com Sun (1997), a reduzida variabilidade genética observada para muitas espécies de plantas daninhas é resultante de vários fatores evolucionários e biológicos, incluindo eventos relacionados ao efeito gargalo associado ao fundador, ao pequeno tamanho da população, ao endocruzamento, à forte seleção direcional e à falta de mecanismos de dispersão para grandes distâncias (Warwich, 1990).

O estudo da variabilidade genética do complexo *Bidens pilosa* L. (picão preto), empregando 10 sistemas de enzimas, revelou 16 locos e destes somente três foram polimórficos. A diversidade genética para este complexo, avaliada por Grombone-Guaratini et al. (2005), foi considerada baixa e o valor do polimorfismo encontrado foi de 3,2%.

A diversidade genética de 40 populações de *E. heterophylla* que crescem no planalto do Rio Grande do Sul, resistentes aos herbicidas inibidores de ALS, foi estudada utilizando o marcador RAPD. Os resultados mostraram que estas populações apresentam variabilidade genética de 60%. Esta variabilidade permitiu o agrupamento das plantas resistentes em sete diferentes grupos (Winkler et al., 2003). A avaliação da diversidade genética de amostras coletadas em diferentes regiões do Paraná também foi realizada por Frigo et al. (2009). Para esta avaliação foram utilizadas isoenzimas esterases como marcadores moleculares e os resultados apontaram para uma alta diferenciação entre as populações estudadas, sugerindo uma reduzida troca de material genético entre elas. Os resultados destes autores mostraram que a diversidade genética para *E. heterophylla* é maior que a observada por outros autores para outras espécies de *Euphorbia*. Estes autores também descreveram que as populações avaliadas apresentaram deficiência de

heterozigotos e que este fato pode ser uma consequência da constante aplicação de herbicidas que tem promovido seleção.

Marcadores RAPD foram utilizados para estudar a variabilidade genética em nível de DNA entre plantas de *E. heterophylla* que apresentaram folhas morfológicamente diferentes. Foram estudadas plantas coletadas em campos de soja de Londrina - PR e as plantas avaliadas foram separadas em dois grupos que coincidiram com as diferenças morfológicas, formato do limbo foliar e forma de ramificação (Vasconcelos et al., 2000).

Marcadores RFLP para DNA de cloroplasto (cpDNA) foram utilizados para investigar acessos de *Euphorbia* spp do continente Norte Americano e Eurásia (Nissen et al., 1992) e sete das 13 sondas usadas para a hibridização foram polimórficas. O acesso mais divergente foi o coletado na Áustria seguido pelos acessos coletados na Itália e Rússia. Os acessos de *Euphorbia* spp dos Estados Unidos foram os que se apresentaram mais intimamente relacionados entre si e com os acessos russos (Nissen et al., 1992). Os estudos realizados por Rowe et al. (1997), com *Euphorbia esula* evidenciaram um alto grau de variabilidade genética para os materiais coletados nos Estados Unidos. Estes autores atribuíram esta alta variabilidade tanto às múltiplas introduções da espécie como também ao elevado grau de variabilidade dentro das populações nativas.

2.7. O uso de marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) no estudo da diversidade genética de plantas daninhas

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) são segmentos de DNA de 100 a 3000 pb, amplificados via PCR, usando *primers* com 16 a 20 pb, desenhados a partir de sequências de microssatélites e que amplificam as sequências inter-SSR. Este tipo de marcador foi idealizado para explorar repetições de microssatélites sem a necessidade de se fazer um sequenciamento prévio do DNA, para analisar sequências do genoma (Zietkiewicz et al., 1994). A técnica para analisar ISSR tem sido apresentada como simples, rápida, eficiente, de baixo custo e de alta reprodutibilidade, possivelmente devido ao uso de *primers* longos, que permitem um subsequente uso de alta temperatura de anelamento (Bornet e Branchard, 2001; Redy et al., 2002). Devido à sua abundância e dispersão no genoma, as

ISSR têm sido muito usadas para estudar relações entre duas populações muito relacionadas (Redy et al., 2002). Estes marcadores ISSR tem sido utilizados para estimar a extensão da diversidade genética em nível inter e intraespecífico em uma ampla variedade de espécies.

Como as ações de manejo que previnem a dispersão e o impacto de espécies invasoras requerem o conhecimento das características ecológicas e genéticas destas plantas, diferentes espécies de plantas invasoras têm sido avaliadas quanto à sua diversidade genética, utilizando marcadores ISSR. Chase et al. (2011) utilizaram ISSR para estudar a diversidade genética em 10 populações da planta invasora *Tanacetum vulgare* (catinga-de-mulata, *tanaceto*, *atanásia* ou erva de São Marcos), uma planta herbácea e perene, pertencente à família Asteraceae. Esses autores avaliaram a diversidade genética dentro e entre as populações coletadas em Minnesota e Montana, nos USA, e em Alberta, no Canadá. Nestes estudos, observaram que existem diferenças genéticas entre as populações, sugerindo que o entendimento da diversidade genética e de sua distribuição dentro e entre as populações pode ajudar a prever o potencial do sucesso de manejo para esta espécie na América do Norte.

As características genéticas de *Rubus phoenicolasius* Maxim. e a ligação com a espécie nativa *Rubus argutus* (Rosaceae), popularmente chamada de amora, foram examinadas por Innis et al. (2011) utilizando o marcador ISSR. Estes autores observaram que a diversidade genética foi menor para a espécie invasora *R. phoenicolasius* quando comparada com a espécie nativa *R. argutus*. McRoberts et al. (2005) utilizaram ISSR e realizaram a avaliação da diversidade intra e inter amostras em 4 populações da erva daninha anual *Phalaris minor* (erva-cabecinha ou talaceiro). Foram estudadas amostras coletadas no estado de Haryana na Índia e os níveis de polimorfismo dentro e entre as populações foi baixo, quando comparado com valores de outras gramíneas invasoras. A análise das semelhanças inter-populacionais permitiu uma diferenciação parcial das quatro populações estudadas.

Štefúnová et al. (2014) descreveram que *Amaranthus* é uma espécie amplamente distribuída em todo o mundo. Estes autores analisaram a variabilidade intra e inter-específica em *Amaranthus caudatus*, *A. cruentus* e *A. hypochondriacus* e mostraram que o marcador ISSR possibilitou a separação

das três espécies e que a maior variabilidade intraespecífica foi para *A. hypochondriacus*. Estes autores descrevem que ISSR é um marcador informativo e que permite analisar molecularmente o gênero *Amaranthus* tanto em nível intra como interespecífico.

Wang et al. (2008) estudaram vinte e oito populações da planta invasora cipó guaco (*Mikania micrantha*) introduzidas no sul da China e observaram que os resultados obtidos forneceram informações para estudar as consequências da expansão em rápida escala. Os parâmetros de genética populacional foram estimados por abordagem Bayesiana, bem como por métodos estatísticos convencionais. Altos níveis de variação e diferenciação genética foram detectados na população de *M. micrantha*. Todas as populações estudadas apresentaram graves gargalos. Neste estudo, os autores não observaram associação entre a distribuição geográfica e o padrão de variação genética das populações. Os resultados obtidos com ISSR indicaram que, durante o processo de invasão de *M. Micrantha*, houve perda de variação genética associada com gargalos, aumentando a diferenciação entre as populações. Os investigadores (Wang et al., 2008) propuseram que eventos de dispersão das sementes, ou propágulos para longas distâncias mediados pelo homem, poderiam explicar a falta de estruturação geográfica na variação genética para esta espécie.

O comportamento de espécies introduzidas também foi avaliado no estudo realizado por Yang (2012). Que trabalhou com *Tithonia diversifolia* (margaridão, boldo-japonês ou girassol-mexicano), uma espécie nativa da América do Norte e da América Central. Esta planta foi introduzida na China no início do século passado e adaptou-se muito bem, tornando-se uma planta invasora prejudicial em regiões tropicais e subtropicais no sul da China. A análise da variação da diversidade genética em populações da China e de regiões vizinhas foi realizada com ISSR. O estudo mostrou altos níveis de diversidade genética em todas as populações, sendo que a menor diversidade foi encontrada em duas populações do Laos. A variação genética foi maior dentro das populações e o método de agrupamento mostrou que as introduções para a China e Laos foram independentes. Neste estudo também não foi observada correlação entre a distância geográfica e as relações genéticas de populações na China e a dispersão parece estar associada à

história de dispersão humana. O autor relatou que os altos níveis de diversidade genética dentro das populações de girassol-mexicano podem ser um desafio para o seu controle e que o potencial de efeitos negativos sobre os sistemas ecológicos desta planta deve ser monitorado.

Tanahara e Maki (2010) examinaram a diversidade genética em três populações de *Bidens cernua*, no Japão, considerada como uma planta anual e descrita como ameaçada de extinção, comumente chamada de picão ou calendula. Os dados obtidos foram comparados com os dados de *Bidens radiata* e *Bidens tripartite* e, contrariando as expectativas, o grau de variabilidade genética em nível de espécie e de populações foram maiores para *B. cernua* do que para *B. radiata* e *B. tripartite*. Esta diversidade genética foi supostamente atribuída ao sistema de reprodução e ao método de formação do banco de sementes, mas todas as três espécies apresentam alta variabilidade genética.

Huangfu et al. (2009) relataram a importância em realizar estudos para avaliar a diversidade genética em populações de plantas daninhas, visando a verificar se a diversidade é a mesma entre as diferentes populações. Estudos desta natureza são especialmente importantes para verificar se existe diferenças para a diversidade genética entre as populações expostas e não expostas à seleção realizada por herbicidas. No estudo realizado por estes autores foram utilizados oito *primers* de ISSR para avaliar os níveis e o padrão de diversidade genética de 93 indivíduos, em 24 populações selvagens de mostarda-oriental, também denominada de mostarda-da-índia ou mostarda-chinesa (*Brassica juncea* L.). A análise da variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da variação ocorreu entre as populações (54,09) e o restante (45,91%) da variância foi atribuída às diferenças entre indivíduos dentro das populações. Apesar da maior diversidade genética ter sido observada em populações de *B. juncea* resistentes, a distribuição geral da diversidade genética não foi dependente da distribuição geográfica. O marcador ISSR também foi utilizado por Imaizumi et al. (2013), que avaliaram os efeitos da seleção ocasionada pelos herbicidas sobre a diversidade genética do junco de caule duro (*Schoenoplectus juncooides*). Foram avaliadas 6 populações resistentes à sulfoniluréia e oito suscetíveis. As plantas foram coletadas de três regiões amplamente separadas: nos distritos de Tohoku,

Kanto e Kyushu no Japão. Imaizumi et al. (2013), diferentemente de Huangfu et al. (2009), sugeriram que o uso do herbicida sulfoniluréia diminuiu a diversidade genética dentro de populações de *S. Juncooides*, as quais são resistentes à sulfoniluréia.

Dinelli et al. (2004) usaram ISSR para estudar três acessos de *Lolium* (azevém ou joio), que cresce na Itália, com o objetivo de determinar a identidade destes acessos. O marcador ISSR possibilitou, em função da grande amplitude de variação nos padrões de bandas, presumir que estes acessos são compostos por indivíduos resultantes de hibridização intragenéricas e intergenéricas do complexo *Lolium-Festuca*. Dois marcadores ISSR discriminatórios do gênero *Festuca* e 20 de espécies de *Festuca* estavam presentes nos três acessos estudados. O acesso resistente, coletado na Toscana, apresentou a maior porcentagem de marcas associadas com *Festuca* (16,8%), seguido pelo acesso resistente, coletado na região de Roma (13,6%) e pelo acesso suscetível, coletado na região de Vetralla (7,6%).

Jin e Ye (2006) descreveram que o controle da erva daninha de jacaré (*Alternanthera philoxeroides*), realizado pelo besouro *Agasicles hygrophila*, tem sido bem sucedido para as plantas que crescem em ambiente aquático, mas não para as plantas que crescem em terra. Para entender se existe influência da base genética para este comportamento, o marcador ISSR foi utilizado. Nenhuma variação genética foi detectada, dentro ou entre as populações que crescem nos mesmos habitats, ou entre as populações que crescem na terra e na água. Estes autores consideraram que a variação genética não é o fator base resultando nas diferenças no controle biológico das populações, mas que o sucesso diferencial para o controle realizado pelo besouro poderia estar associado à plasticidade fenotípica do diâmetro do caule da planta, em vez de estar associado a variações genotípicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de coleta das sementes de *Euphorbia heterophylla*

Para a realização deste trabalho, foram coletadas amostras de *Euphorbia heterophylla* de 10 localidades diferentes dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. Oito amostras foram coletadas em diferentes regiões do estado do Paraná, uma em Rio dos Índios; no Rio Grande do Sul, e uma amostra em Cosmorama, no estado de São Paulo. Foram coletadas plantas individuais e embaladas separadamente. Na sequência, as sementes de cada planta foram transplantadas em vasos, com cada vaso representando uma localidade. Para cada amostra coletada foi avaliado um número diferente de indivíduos (Quadro 2), totalizando 132 amostras estudadas. No Quadro 2 e na Figura 3, estão representadas as cidades da coleta, o número de plantas avaliadas por pontos de coleta e as localizações geográficas dos pontos de coleta, de acordo com o sistema Universal Transversal de Marcador (UTM).

Quadro 2 - Local de coleta das sementes de *Euphorbia heterophylla*, número de plantas utilizadas e localização geográfica

Ponto de coleta cidade/ estado	Número de plantas avaliadas	Localização geográfica (UTM*)
Região de Pato Branco (Werner)-PR (Pato Branco I)	13	26°13'6,27" S 52°38'56,83" W
Região de Pato Branco (Marafon)-PR (Pato Branco II)	17	26°11'43,83" S 52°43'14,49" W
Cosmorama-SP (Agro Cosmos)	13	20°28'40" S 49°46',40" W
Maringá-PR	14	23°25'38" S 51°56'15" W
Região de Pato Branco (Antonieto)-PR (Pato Branco III)	07	26°17'2,78" S 52°39'48,13" W
Ivaiporã-PR	16	24°14'26,14" S 51°36'16,58" W
São Miguel do Iguazú-PR	14	25°20'49,65" S 54°16'9,50" W
Rio dos Índios-RS	11	27°17'53" S 52°50'51" W
Jandaia do Sul-PR I	15	23°36'13" S 51°38'34"W
Jandaia do Sul-PR II	12	23°36'15" S 51°38'36" W

*Projeção Marcador Transversal Universal (Universal Transversal de Marcator).



Figura 3 - Localização dos 10 pontos de coleta de sementes de *Euphorbia heterophylla*, oito no estado do Paraná, um no Rio Grande do Sul e um em São Paulo.

3.2. Germinação das sementes

Para a germinação das sementes, o experimento foi conduzido em condições ambiente na Universidade Estadual de Maringá (UEM). As sementes coletadas dos 10 locais foram semeadas em vasos separadamente e preenchidos com uma mistura composta de terra (Latosolo Vermelho Escuro),

substrato Plantmax e areia média nas proporções de 2:1:2. Em cada vaso, foram semeadas em torno de 50 sementes.

Para a extração do DNA utilizado no estudo da variabilidade genética, foram coletadas 100 mg de folhas jovens de plantas individuais de cada genótipo (local), totalizando 132 amostras de DNA extraídos.

3.3. Extração e quantificação do DNA de folhas de *Euphorbia heterophylla*

O DNA genômico de cada planta foi extraído seguindo a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações.

As amostras de folhas foram maceradas utilizando nitrogênio líquido. O pó produzido foi adicionado em microtubos esterilizados com 800 µL de tampão de extração CTAB (Quadro 3) pré-aquecido em 65 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria, a 65 °C, por 60 minutos, e os microtubos foram agitados, por inversão, a cada 5 minutos. Estes foram retirados do banho-maria e mantidos na bancada para alcançarem a temperatura ambiente. Foram adicionados 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1 e em seguida os microtubos foram novamente invertidos por 5 minutos.

Posteriormente, efetuou-se uma centrifugação a 7.000 rpm, por 5 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi pipetado e transferido para um novo microtubo. Na fase aquosa obtida, foram adicionados 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram novamente agitados suavemente por 5 minutos. Após uma nova centrifugação a 7.000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante coletado foi transferido para um novo tubo de micro centrífuga. Para precipitar o DNA, foram adicionados 0,6 volume de isopropanol gelado por volume de sobrenadante recuperado, misturando levemente por inversão por 1 minuto. As amostras foram mantidas por 12 horas em -20 °C para obter o DNA precipitado.

Após a etapa descrita acima, foi feita uma centrifugação a 7.000 rpm, por 5 minutos, em temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado, adicionando 800 µL de etanol 70% gelado, misturando-se levemente por inversão, por 1 minuto, para lavar o *pellet* de DNA, seguindo-se com nova centrifugação a 7.000 rpm, por 5 minutos e em 4 °C. O sobrenadante foi

descartado e o “pellet” de DNA seco em temperatura ambiente. Na sequencia, foram adicionados 400 µL de TE (Tris/HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1,0 mM pH 8,0). Para ressuspender o DNA, as amostras foram mantidas, por 12 horas, em 4 °C.

Após este período, foram adicionados 2 µL de RNase na concentração de 10 ng/µL e a mistura foi mantida na temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, o DNA foi purificado, adicionando 200 µL de fenol mais 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), realizando-se agitação suave, durante 5 minutos, e centrifugando a 7.000 rpm, por 5 minutos, em temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo, adicionando 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguindo com agitação, durante 5 minutos, e centrifugação, a 7.000 rpm, por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo, adicionando-se 250 µL de isopropanol e 25 µL de NaCl 5M, os quais foram misturados por inversões suaves, por 1 minuto, mantendo-se essa mistura *overnight* a -20 °C.

Na sequencia, foi realizada outra centrifugação a 7.000 rpm, por 5 minutos, em temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol 70% gelado, misturando-se, por inversão, durante 1 minuto. Após efetuar uma nova centrifugação usando 7.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente e ressuspensionado em 50 µL de TE. O DNA foi armazenado em microtubos em temperatura de 4 °C.

Quadro 3 - Constituintes e as concentrações usadas no preparo do tampão de extração para extrair o DNA das amostras de *Euphorbia heterophylla*

Componentes e suas concentrações nos estoques	Volume / 10 mL	Concentração final no tampão de extração
CTAB 1% ¹	0,10 g	1%
NaCl 5M	1,4 mL	700 mM
TRIS-HCl 1M pH 7,5	1,0 mL	100 mM
EDTA 0,5 M pH 8,0	1,0 mL	50 mM
β-Mercaptoetanol	0,1 mL	140 mM
Água Destilada	6,5 mL	

¹ Adicionar β-Mercaptoetanol somente no momento de uso.

O DNA extraído de cada amostra foi quantificado, utilizando o equipamento *Picodrop Spectrophotometer* (Pico 100 – Version 4.0/21/03/11). Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas na concentração de 10 ng/μL a cada 15 dias e também mantidas em geladeira.

3.4. Amplificação e análise dos ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Para selecionar os *primers* utilizados no presente estudo, foram avaliados 30 *primers* de ISSR, que fazem parte do banco de *primers* do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (DBC/UEM) (Quadro 4). Para o uso de cada *primer*, foi testada a concentração de DNA (de 10 e 15 ng), a concentração do MgCl₂ (foram testadas as concentrações de 2,0 e 2,4 mM), a concentração do *primer* (0,2 e 0,4 μM) e a temperatura de anelamento foi testada, variando de 49 °C a 51 °C para cada *primer*. Dos 30 *primers* testados, foram selecionados nove, os quais apresentaram um padrão de fragmentos amplificados bem definido. Os *primers* que, após estes testes, não amplificaram fragmentos específicos não foram usados.

Quadro 4 - Sequência dos 30 *primers* ISSR avaliados para amplificar o DNA de *Euphorbia heterophylla*

Primer ISSR	Sequência de bases nitrogenadas
ISSR-1	(AC) ₈ TT
ISSR-2	(AC) ₈ AG
ISSR-3	(AC) ₈ TG
ISSR-4	(GACA) ₄
ISSR-5	(AC) ₈ AA
ISSR-6	(AG) ₈ TA
ISSR-7	(AG) ₈ GA
ISSR-8	(ACTC) ₄
ISSR-9	(TG) ₈ GG
ISSR-10	(CTC) ₆
ISSR-11	(AC) ₈ CA
ISSR-12	(AG) ₈ GCT
ISSR-13	(AC) ₈ CC
ISSR-14	(AC) ₈ CT
ISSR-15	(AC) ₈ GA
ISSR-16	(TG) ₈ AC

Quadro 4, cont.

ISSR-17	(AG) ₈ CG
ISSR-18	(AG) ₈ TT
ISSR-19	(AG) ₈ TG
ISSR-20	(AG) ₈ CC
ISSR-21	(GA) ₈ T
ISSR-22	(TG) ₈ CC
ISSR-23	(AG) ₈ AT
ISSR-807	(AG) ₈ T
ISSR-811	(GA) ₈ C
ISSR-813	(CT) ₈ T
ISSR-816	(CA) ₈ T
ISSR-822	(TC) ₈ ^a
ISSR-825	(AC) ₈ T
ISSR-828	(TG) ₈ ^a

A PCR (Polimerase Chain Reaction; reação em cadeia da polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, sendo utilizado para a reação 10 ou 15 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8), 2,0 ou 2,4 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 1 U de Taq-DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 0,2 ou 0,4 μM de primer e água mili-Q para um volume final de 20 μL de solução (Quadro 5). A PCR foi realizada no termociclador (Techne TC-512), seguindo as temperaturas descritas no Quadro 6.

Quadro 5 - Concentrações dos reagentes estoques, concentração final e volume utilizado após a padronização nas reações de amplificação em cadeia da polimerase para as amostras de DNA de *Euphorbia heterophylla*

Reagentes	Concentração estoque dos reagentes	Concentração final dos reagentes	μL/20 μL de reação
H ₂ O	-	-	Variável
Tampão	10 X	1 X	2,0
MgCl ₂	25 mM	2,0 - 2,4 mM	1,6 - 1,92
dNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
Primer	10 μM	0,2 - 0,40 μM	0,4 - 0,8
Taq-DNA Polimerase	5 U/ μL	1 U	0,2
DNA	10 ng/ μL	10 - 15 ng	1,0 - 1,5
Total			20 μL

Após a amplificação, para cada amostra foram acrescentados 2 μ L de tampão *loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e estas foram separadas em gel de agarose 1,5 % usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM de Tris, 44,5 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA), tanto para o preparo do gel como para as cubas de separação. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados e separados no gel, foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen). Para a eletroforese, os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts por 4 horas e, após este período, estes foram corados em solução de brometo de etídio preparada com 0,5 μ g/mL. A imagem dos fragmentos no gel foi capturada em transiluminador L-PIX HE, *Loccus biotecnologia*.

Quadro 6 - Sequência das etapas do programa utilizado para a amplificação do DNA de *Euphorbia heterophylla* com marcador ISSR

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94 °C	5 min.
2	Desnaturação	94 °C	1 min.
3	Anelamento	49 °C a 51 °C	1 min.
4	Extensão	72 °C	1 min. e 30 s
5	Voltar ao passo 2 - 34 vezes	-	-
6	Extensão final	72 °C	7 min.
7	Imersão	4 °C	∞

Na análise do produto amplificado para cada *primer* de ISSR e para cada amostra analisada, os fragmentos foram lidos como presentes (1) ou ausentes (0) e uma matriz binária foi construída. Os níveis de diversidade genética dentro das populações, representado pelo índice de polimorfismo (PI, calculado como porcentagem de locos polimórficos), a diversidade genética de Nei (He) (Nei, 1973), o índice de diversidade de Shannon (I) (Lewontin, 1972) e as diferenças genéticas entre as populações (G_{ST}) (Nei, 1972) foram calculados utilizando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este mesmo programa também foi utilizado para calcular a distância e a identidade genética de Nei entre todos os pares de populações e, a partir do coeficiente de similaridade obtido usando o método

de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*), foi construído um dendrograma (Figura 8).

Para a análise, foi utilizado também o programa STRUCTURE v 2.3.2. (Pritchard et al., 2000), que se baseia na determinação de grupos heteróticos a partir de dados moleculares. O método de Evanno et al. (2005) foi utilizado para estimar o ΔK .

A variância molecular (AMOVA) foi calculada utilizando o programa GenALEx versão 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). Nesta análise, foram estimados os fracionamentos da diversidade genética entre e dentro das populações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil da amplificação dos segmentos de DNA entre os microssatélites (ISSR)

A observação de bandas nítidas e bem definidas no gel de agarose, resultado de condições adequadas de amplificação do DNA das amostras de *E. heterophylla*, foi obtida quando a reação de amplificação foi realizada, utilizando 10 ng de DNA, 2,4 mM de MgCl₂ e 0,4 μM de cada *primer* utilizado, com temperaturas específicas para cada *primer* variando de 49 a 51 °C (Figura 4 e Quadro 6). A Figura 4 mostra o resultado da amplificação do DNA de três amostras distintas, realizada com o *primer* ISSR-19, usando as temperaturas de anelamento em 50 e 51 °C. Como a temperatura de 50 °C foi a que apresentou segmentos de DNA formando bandas nítidas e bem definidas, esta foi a temperatura utilizada para avaliar o DNA das 132 plantas de *E. heterophylla*.

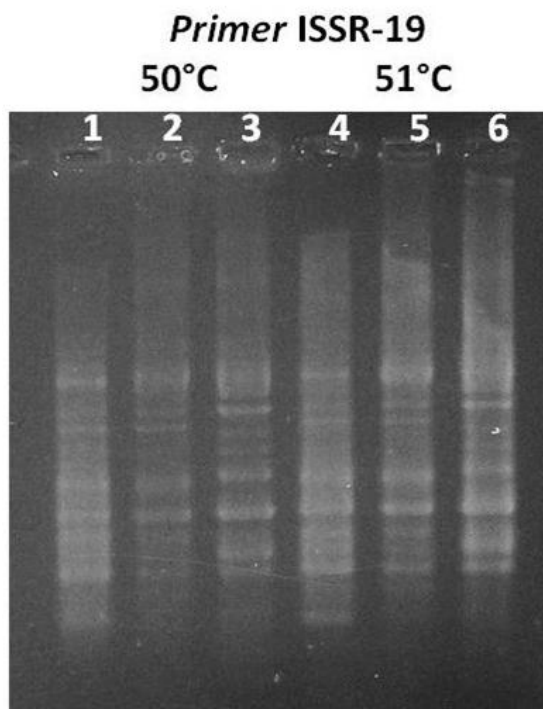


Figura 4 - Resultado da amplificação do DNA com o *primer* ISSR-19, utilizado para avaliar e selecionar diferentes temperaturas de anelamento; amostras 1, 2 e 3 foram amplificadas com a temperatura de anelamento de 50 °C; amostras 4, 5 e 6 são os mesmos DNAs amplificados, mas em temperatura de 51 °C.

A importância de padronizar as reações de amplificações, para identificar marcadores ISSR mostrada na Figura 4, está de acordo com os relatos e orientações de outros investigadores. Segundo Caetano-Anollés (1993), as concentrações de *primer*, cloreto de magnésio e nucleotídeos, bem como os parâmetros cíclicos de temperatura e outros componentes da reação de amplificação, podem alterar o rigor da reação e influenciar dramaticamente tanto no número como na natureza dos produtos de amplificação. Caetano-Anollés (1993) descreveu que o uso de *primers* arbitrários para amplificar o DNA requer uma adequada discriminação entre os fragmentos reais e os artefatos. Esta discriminação deve ser realizada em função da natureza não estridente do *primer* no ambiente de reação. Na tentativa de manter o fino equilíbrio do processo, este autor sugere que os níveis dos componentes reacionais devam ser cuidadosamente otimizados. Geralmente, a temperatura é alterada para favorecer a formação de produtos de boa qualidade. No entanto, variação nos intervalos de tempo e temperatura para o anelamento, extensão e desnaturação, número de ciclo, ou até mesmo as taxas de aquecimento e resfriamento podem complicar a uniformidade do resultado da técnica de amplificação. Portanto, vários parâmetros associados ao *primer*, concentrações de íons, ou com a própria DNA polimerase devem ser considerados para melhorar o resultado das reações.

Após os investimentos para padronizar as reações de amplificações, apenas 9 *primers* amplificaram o DNA das 132 amostras de *E. heterophylla* e apresentaram bandas bem definidas no gel: ISSR-2, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-17, ISSR-18, ISSR-19 e ISSR-811 (Quadro 7). Estes *primers* foram utilizados para amplificar o DNA das 132 amostras dos 10 pontos de coletas, gerando um total de 133 segmentos de DNA reproduzíveis (bandas). Destes fragmentos, 45 foram polimórficos para as plantas da amostra 1 da região de Pato Branco – Werner (polimorfismo de 33,83%); 117 foram polimórficos para as plantas do local 2 da região de Pato Branco – Marafon-PR (polimorfismo de 87,97%); 84 foram polimórficos para as plantas da amostra 3 de Cosmorama - SP (polimorfismo de 63,16%); 82 foram polimórficos para as plantas da amostra 4 de Maringá PR (polimorfismo de 61,65%); 78 foram polimórficos para a amostra 5 da região de Pato Branco – Antonieto PR (polimorfismo de 58,65%); 107 foram polimórficos para a amostra 6 de Ivaiporã

PR (polimorfismo de 80,45%); 64 foram polimórficos para as plantas da amostra 7 de São Miguel do Iguaçu PR (polimorfismo de 48,12%); 74 foram polimórficos para as plantas do local 8 da região de Rio dos Índios RS (polimorfismo de 55,64%); 81 foram polimórficos para as plantas do local 9, que corresponde à região de Jandaia I-PR (polimorfismo de 60,90%) e 57 foram polimórficos para as plantas do local 10, região de Jandaia II-PR (polimorfismo de 42,86%) (Quadro 8).

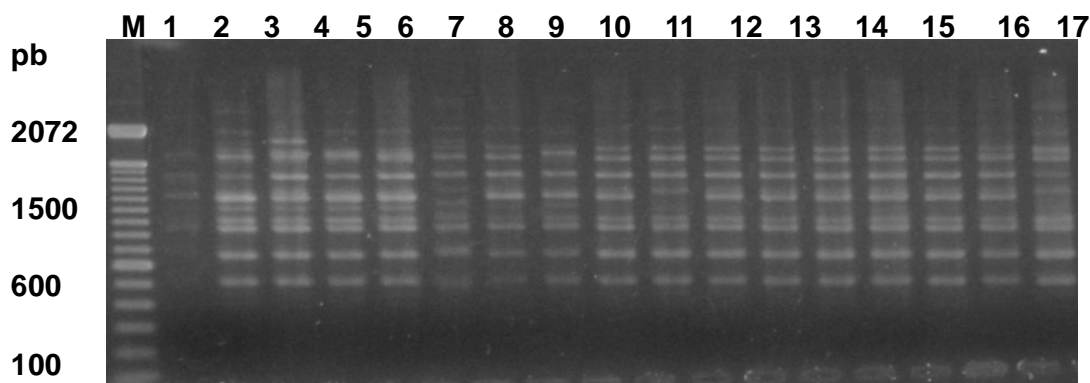


Figura 5 - Gel de agarose comum, preparado com a concentração de 1,5% e utilizado para separar os segmentos de DNA amplificados com o primer ISSR-811 para as amostras coletadas em São Miguel do Iguaçu-PR (1 e 2), Rio dos Índios-RS (3 a 13) e Jandaia I-PR (14 a 17). M é o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen).

Na avaliação dos nove ISSR usados para amplificar o DNA de *E. heterophylla* foi possível observar que o número médio de fragmentos produzidos por *primer* foi de 14,66 e o número de segmentos de DNA por *primer* variou de 9 a 21. O menor número de segmentos (9) foi produzido pelo *primer* ISSR-2 e o maior número de segmentos (21) foi produzido pelo *primer* ISSR-12 (Quadro 7). Na Figura 5, estão evidentes os segmentos de DNA amplificados utilizando o *primer* ISSR-811.

Em estudos futuros, o *primer* ISSR-12, por ter amplificado um número maior de segmentos de DNA (21), pode ser indicado como o mais adequado para investigar o polimorfismo em sequências interlocos SSR no genoma de leiteiro que infesta culturas de diferentes regiões do continente. Os demais oito *primers* também podem ser indicados como adequados para os estudos de diversidade genética no genoma de leiteiro, em ordem decrescente do número

de segmentos que amplificaram (ISSR-17, ISSR-18, ISSR-11, ISSR-7, ISSR-811, ISSR-19, ISSR-6 e ISSR-2).

Quadro 7 - *Primers* para ISSR, sequências de nucleotídeos dos *primers* ISSR, número de segmentos amplificados por *primer* nas 132 amostras de *E. heterophylla* com suas respectivas temperaturas de anelamento

<i>Primers</i>	Sequências (5' → 3')	Temperaturas de anelamento (°C)	Segmentos amplificados
ISSR-2	(AC) ₈ AG	51°C	9
ISSR-6	(AG) ₈ TA	51°C	12
ISSR-7	(AG) ₈ GA	51°C	14
ISSR-11	(AC) ₈ CA	51°C	15
ISSR-12	(AG) ₈ GCT	52°C	21
ISSR-17	(AG) ₈ CG	51°C	19
ISSR-18	(AG) ₈ TT	50°C	16
ISSR-19	(AG) ₈ TG	50°C	13
ISSR-811	(GA) ₈ C	49°C	14
TOTAL			133

A lista de *primers* ISSR selecionada no presente estudo é importante porque é inédita para a espécie de leiteiro encontrada em diversos estados da região Sul do Brasil, denominada *E. heterophylla* por pesquisadores (Vidal e Winkler, 2002). Determinados segmentos de DNA-ISSR poderão ser selecionados e adotados para monitorar, em nível molecular, a estabilidade genética das plantas de leiteiro nos ciclos de infestações e combate destas invasoras de grandes culturas de importância econômica. Podem também serem considerados como marcadores moleculares, candidatos em potencial para acompanhar pesquisas sobre variações fenotípicas, sistemática e taxonomia do gênero *Euphorbia*. Também poderão ser úteis em estudos envolvendo características relacionadas à agressividade e ao potencial reprodutivo, as quais, de acordo com Brighenti e Oliveira (2011), conferem maior ou menor dificuldade no controle de plantas invasoras.

4.2. Estudo da diversidade e diferenciação genética de populações e sua estrutura genética

A estimativa de diversidade genética está apresentada no Quadro 8. A diversidade genética de Nei (He) e o índice de Shannon (I) médios para as amostras de *E. heterophylla* avaliadas neste estudo foram 0,3589 e 0,5345 respectivamente. Em nível populacional, foi observada uma ampla diversidade genética. O polimorfismo médio nas sequências interlocos SSR (ISSR) foi alto (98,50 %), sendo maior para as plantas da amostra coletada em Pato Branco II, no estado do Paraná (87,97%). A porcentagem de locos polimórficos variou de 33,83 a 87,97%; as plantas com maior e com menor polimorfismo foram coletadas em diferentes localidades de Pato Branco (Pato Branco I e Pato Branco II, respectivamente). A diversidade genética de Nei (He) e o índice de Shannon variaram entre as amostras: de 0,1335 a 0,3800 e de 0,1948 a 0,5462, respectivamente (Quadro 8). Esta alta divergência genética avaliada por estes parâmetros diferentes indica que as amostras de leiteiro analisadas são geneticamente divergentes e isso implica em diferentes capacidades de invasão, conforme descrito por Sakai et al. (2001). Estes autores descrevem que uma reduzida diversidade genética limita a evolução de uma população. Uma espécie invasora pode ser pré-adaptada para alguns aspectos de seu novo habitat, entretanto, outros aspectos podem ser novos para elas. Estes autores apontam que, para uma planta invasora se estabelecer, é imprescindível que ela apresente algum grau de pré-adaptação, além de apresentar uma boa capacidade de colonização seguida pela colonização inicial.

O estudo da variação genética pode ajudar a prever o potencial que populações de plantas daninhas apresentam para evoluir em resposta às práticas de controle, isto é, o desenvolvimento da resistência a herbicidas ou a agentes de controle biológico (Barrett, 1992; Van Driesche e Bellows 1996). O estudo da variabilidade genética de populações de plantas daninhas é de grande importância para o manejo, primariamente porque esta variabilidade pode interferir na eficiência de vários métodos de controle. Os principais métodos usados para o manejo de plantas daninhas incluem o biológico, o químico, o cultural e o físico (Radosevich et al., 1997). O sucesso dos

programas de manejo de plantas daninhas está associado à variabilidade genética.

Quadro 8 - Número de alelos observados (Na), Número efetivo de alelos (Ne), Índice de Shannon (I), Diversidade genética de Nei (1973) (He), número de locos polimórficos e porcentagem de locos polimórficos para cada amostra de *Euphorbia heterophylla* estudada

Amostra	Na	Ne	He	I	Nº de locos polimórficos	% de locos polimórficos
Pato Branco I	1,3383	1,2381	0,1335	0,1948	45	33,83
Pato Branco II	1,8797	1,6908	0,3800	0,5462	117	87,97
Cosmorama	1,6316	1,4399	0,2466	0,3599	84	63,16
Maringá	1,6165	1,4502	0,2488	0,3608	82	61,65
Pato Branco III	1,5865	1,3972	0,2225	0,3269	78	58,65
Ivaiporã	1,8045	1,5765	0,3213	0,4671	107	80,45
São Miguel do Iguazú	1,4812	1,2934	0,1708	0,2545	64	48,12
Rio dos Índios	1,5564	1,3917	0,2195	0,3202	74	55,64
Jandaia I	1,6090	1,3713	0,2172	0,3202	81	60,90
Jandaia II	1,4286	1,2548	0,1487	0,2222	57	42,86
Média/loco	1,9850	1,6130	0,3589	0,5345	78,9	98,50

A diversidade total (H_t) para todas as plantas dos 10 locais de coletas avaliada foi 0,3611 e o nível de divergência genética estimado para os marcadores de ISSR destas plantas, representado pelo coeficiente de diferenciação gênica (G_{ST}) foi alto (0,3607). Os valores altos para diversidade total e coeficiente de diferenciação representam a grande variação para alguns segmentos de ISSR, indicando que as nove amostras coletadas nas diferentes regiões do Paraná e uma amostra coletada no Rio Grande do Sul (Rio dos Índios) formam amostras geneticamente divergentes. De acordo com Wright (1978), valores de G_{ST} maiores do que 0,25 indicam um nível muito alto de divergência interpopulacional ou nível muito alto de diferenciação genética entre as populações.

Uma grande diferença para a variação genética entre diferentes populações tem sido atribuída a uma limitada dispersão espacial ou a uma recente redução da variação genética causada por ações humanas (Allendorf e Luikart, 2007). A forma de dispersão de sementes em *E. heterophylla* não prevê uma dispersão espacial limitada porque a dispersão de sementes no gênero *Euphorbia* tem sido descrita como explosiva (Narbona et al., 2005), contando também com a contribuição de diferentes espécies de formigas para

este processo. Segundo Gómez e Espadaler (1998), a distância média de dispersão realizada por estes organismos tem sido positivamente correlacionada com o tamanho e com a espécie de formiga. A espécie *E. heterophylla* se reproduz exclusivamente por sementes e a reprodução pode ocorrer tanto por autofecundação como fecundação cruzada (Cronquist, 1981; Barroso, 1991). Após a fecundação, desenvolvimento e amadurecimento do fruto, a cápsula se rompe, explosivamente, lançando as sementes para locais distantes da planta-mãe (Suda, 2001). A maturação dos frutos numa só planta não ocorre simultaneamente, o que possibilita a produção de sementes por um longo período (Costa, 1982; Kissmann e Groth, 1997) e cada planta produz grande quantidade de sementes, comparadas com outras plantas daninhas, e isso aumenta seu potencial de dispersão (Suda, 2001).

A estimativa do fluxo gênico entre as 10 amostras de leiteiro analisadas também não está de acordo com uma premissa limitada de dispersão espacial de alelos. Baseado no valor do G_{ST} , o número estimado de migração por geração (Fluxo gênico - Nm) foi moderado ($Nm = 0,8864$), mas próximo de um valor considerado alto. De acordo com Govindaraju (1989), valores de Nm variando entre 0,25 até 0,99 indicam um fluxo gênico intermediário; $Nm > 1,0$ indica fluxo gênico alto entre populações. Desta forma, o nível muito alto de diferenciação genética entre as 10 amostras de leiteiro poderia ser resultado da interferência do homem ou, ainda, consequência de um efeito fundador aliado ao potencial de colonização, inerente de plantas invasoras, a exemplo de *E. heterophylla* (Vasconcelos et al., 2000; Vidal e Winkler, 2002).

Vasconcelos et al. (2000) consideraram *E. heterophylla* uma espécie de planta invasora que pode acarretar perdas de até 33% na cultura da soja e, de acordo com os registros de Vargas et al. (2001), a forma predominante de controle desta espécie é a aplicação de herbicidas. A espécie *E. heterophylla* foi considerada de difícil controle, sendo necessário muitas vezes repetidas aplicações de herbicidas e também combinações de vários deles para amenizar as perdas de produtividade nas culturas infestadas (Willard e Griffin, 1993). Aplicações de tipos e de doses de herbicidas diferentes, bem como a frequência e o número de aplicações ao longo do tempo podem selecionar genótipos (grupos de alelos) diferentes em *E. heterophylla*, conduzindo à diferenciação observada.

A análise do polimorfismo dos marcadores ISSR nas 10 amostras de leiteiro, utilizando a estatística bayesiana (Pritchard et al., 2000; Evanno et al., 2005) ilustra bem uma provável seleção de grupos de alelos em cada amostra. O valor ótimo de K determinado pela análise bayesiana indicou que as plantas das 10 localidades foram agrupadas em seis grupos ancestrais ($K = 6$; $\Delta K = 31,7853$). O gráfico *bar plot* obtido está apresentado na Figura 6 e a distribuição das amostras no *bar plot* ilustra os grupos distintos (representados pelas seis cores) e bem definidos de alelos para algumas amostras.

As amostras I e II da Região de Pato Branco, por exemplo, apresentam grupos ancestrais de alelos predominantes e distintos, apesar de terem sido coletadas na mesma região. Na amostra I, há o predomínio de alelos do grupo verde, enquanto na amostra II o predomínio é de alelos dos grupos vermelho e amarelo, com algumas amostras que compartilham alelos de outros grupos e frequências inferiores a 30%. Os alelos do grupo verde predominantes na amostra I de Pato Branco foram observados com frequência muito baixa nas demais amostras de *E. heterophylla* (Figura 6).

Nas amostras I e II de Jandaia, é possível observar o predomínio do mesmo grupo de alelos (azul claro) com algumas plantas compartilhando alelos de outros grupos com frequência baixa. O predomínio do mesmo grupo de alelos nas duas amostras de Jandaia, assim como o predomínio de alelos do grupo amarelo nas amostras de Maringá e de Cosmorama pode ser resultado do fluxo gênico entre as amostras ou de procedimentos similares de métodos de controle.

Nas amostras de Ivaiporã e de Rio dos Índios, é possível observar maior número de plantas que compartilham alelos de 5 ou 6 grupos. O acentuado predomínio de grupos de alelos verificado nas amostras de Pato Branco I (verde), Pato Branco III (vermelho), Mandaguaçu e Maringá (amarelo), São Miguel do Iguçu (azul escuro) e Jandaia I e II (azul claro), é menor nas amostras de Ivaiporã e de Rio dos Índios (Figura 6). Esse resultado indica que a suposta pressão de seleção decorrente de aplicação de herbicidas não determinou a seleção de um dos grupos de alelos de forma predominante nas amostras de Ivaiporã e Rio dos Índios.

Apesar do predomínio de grupos de alelos em determinadas amostras de *E. heterophylla* [Pato Branco I (verde), Pato Branco III (vermelho),

Cosmorarama e Maringá (amarelo), São Miguel do Iguaçu (azul escuro), e Jandaia I e II (azul claro)], supostamente determinado por pressão de seleção artificial, a evidência de algumas plantas compartilhando alelos de cinco ou seis grupos conferiu uma variância molecular alta dentro das amostras. A análise da AMOVA indicou que 68% da variação genética total está presente dentro das amostras ($P < 0,001$), enquanto a variação entre as amostras foi 32% (Figura 07 e Quadro 9).

Variabilidade genética alta também tem sido descrita em amostras de *E. heterophylla*, utilizando outros tipos de marcadores moleculares. Winkler et al. (2003) estudaram 20 plantas de quarenta populações, coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e separadas em sete grupos, utilizando trinta marcadores RAPD, observaram que o coeficiente médio de similaridade foi de apenas 40%. O mesmo marcador molecular (RAPD) também foi utilizado por Vasconcelos et al. (2000) para estudar plantas coletadas na região de Londrina, PR, e para estas amostras foi descrito um polimorfismo menor (37,25%) do que o polimorfismo relacionado no Quadro 8 para a maioria das amostras de leiteiro analisadas no presente estudo.

Um polimorfismo tão alto quanto o observado no presente estudo com marcadores ISSR (98,5%) foi descrito para 12 amostras de *E. heterophylla*, em análise de 6 locos para isozimas α - e β -esterases: 87,5% (Frigo et al., 2009). Entretanto, não é possível estabelecer uma relação positiva para valores altos de polimorfismo para isozimas α -/ β -esterases e marcadores ISSR em *E. heterophylla*, porque nas amostras de São Miguel do Iguaçu analisadas por Frigo et al. (2009) o polimorfismo de α -/ β -esterases foi maior (75%) do que o polimorfismo dos marcadores ISSR (48,12%) estimados no presente estudo.

Quadro 9 - Resumo da análise de variância molecular (AMOVA) das 10 amostras de *Euphorbia heterophylla* coletadas em diferentes locais, baseada em dados de marcadores ISSR. Os valores de P foram calculados por um procedimento de 1000 permutações

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Variância total (%)	Valor de P
Entre as populações	9	927,748	6,769	32%	<0,001
Dentro das populações	122	1725,869	14,146	68%	< 0,001
Total	131	2653,616	20,915	100%	

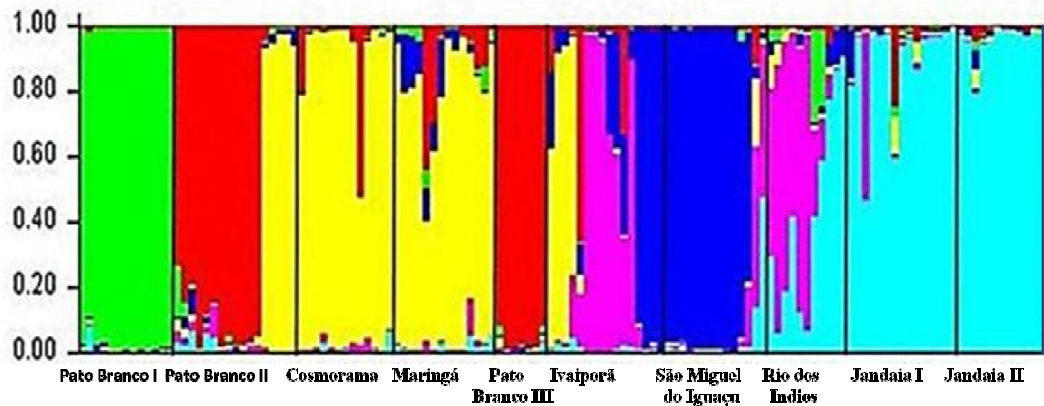


Figura 6 - *Bar Plot* das 132 amostras de *Euphorbia heterophylla* agrupadas em 6 grupos. Grupo 1 (verde), grupo 2 (vermelho), grupo 3 (amarelo), grupo 4 (lilás), grupo 5 (azul escuro) e grupo 6 (azul claro).

O valor de identidade e similaridade genética estimado pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*) mostrou que as amostras de Jandaia I e Jandaia II são as mais similares ($I = 0,9416$) e que as amostras de Pato Branco I e Pato Branco III são as mais divergentes ($I = 0,6915$) (Quadro 10). O dendrograma apresentando as relações de identidade entre as amostras dos 10 locais de coleta pode ser visto na Figura 8. Este dendrograma mostra a formação de um grande grupo, não fazendo parte deste agrupamento somente as amostras de Pato Branco I e Pato Branco III, as quais ficaram fora do grupo com amostras individualizadas.

Porcentagem de Variância Molecular

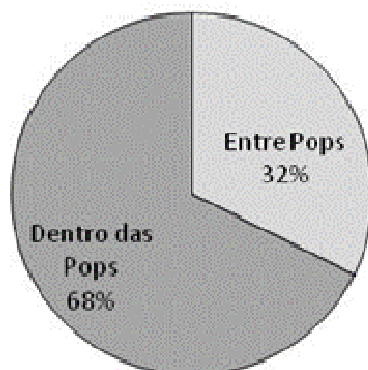


Figura 7 - Porcentagem de variância molecular (AMOVA) observada dentro e entre as 10 amostras de *Euphorbia heterophylla*, obtida com a avaliação de marcadores ISSR.

O intervalo dos valores de identidade genética (I) estimados entre 0,6915 e 0,9416 indica uma ampla base genética para as 10 amostras de *E. heterophylla* coletadas. O nível de divergência genética interpopulacional na espécie *E. heterophylla* pode ser observado no dendrograma para as 10 amostras. O resultado do agrupamento mostra que a divergência genética é independente da distância geográfica. A falta de concordância entre o padrão de distribuição geográfica e a identidade genética para plantas dos dez locais de coleta é um indicativo adicional de que há uma pressão de seleção diferencial ou da heterogeneidade dos fatores ambientais.

Quadro 10 - Coeficiente de similaridade (diagonal superior) e distância genética de Nei (diagonal inferior) avaliados para as sequencias ISSR de plantas de *Euphorbia heterophylla* coletadas em 10 localidades

Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	****	0,780	0,796	0,827	0,692	0,789	0,811	0,811	0,801	0,778
2	0,249	****	0,876	0,825	0,817	0,872	0,813	0,823	0,820	0,806
3	0,228	0,132	****	0,882	0,754	0,834	0,825	0,855	0,846	0,837
4	0,192	0,161	0,125	****	0,768	0,883	0,860	0,828	0,853	0,843
5	0,369	0,202	0,282	0,265	****	0,761	0,721	0,724	0,723	0,712
6	0,237	0,137	0,182	0,124	0,273	****	0,902	0,858	0,886	0,848
7	0,210	0,208	0,193	0,152	0,328	0,103	****	0,885	0,894	0,870
8	0,209	0,195	0,157	0,189	0,323	0,153	0,122	****	0,902	0,872
9	0,222	0,199	0,166	0,159	0,324	0,121	0,112	0,103	****	0,942
10	0,251	0,216	0,178	0,171	0,340	0,165	0,140	0,137	0,060	****

1 - Pato Branco, 2 - Pato Branco II, 3 – Cosmorama, 4 - Maringá, 5 - Pato Branco, 6 - Ivaiporã, 7 - S. Miguel guaçu, 8 - Rio dos Índios, 9 Jandaia I, 10 – Jandaia II.

Como os registros de aplicações de tipos e doses de herbicidas, bem como a frequência e o número de aplicações efetuadas em cada uma das 10 amostras de leiteiro analisadas no presente estudo são desconhecidos, o efeito fundador, aliado à capacidade de colonização de *E. heterophylla* poderia ser uma alternativa plausível para explicar a organização diferenciada em nível molecular, formando populações altamente estruturadas. Alguns estudos têm mostrado que as populações de espécies que colonizam novos habitats apresentam diversidade genética elevada (Kolbe et al., 2004; Genton et al.,

2005). Populações fundadoras com diversidade genética alta são consideradas como tendo alto potencial de colonização (Novak e Mack, 2005; Roman, 2007; Dlugosch e Parker, 2008) e, em algumas circunstâncias o evento de colonização pode ser realizado por poucos indivíduos, representando somente uma fração da variação genotípica da espécie, criando um gargalo populacional (Puillandre et al., 2008). As espécies colonizadoras experimentam habitats que, muitas vezes, diferem quanto às condições abióticas ou bióticas em relação ao seu novo habitat, mas é esperado que a diversidade genética existente nestas populações aumente o sucesso de colonização, permitindo uma rápida adaptação (Sakai et al., 2001; Lee, 2002; Holt et al., 2005). De acordo com Huston (1997) e Loreau e Hector (2001), altos níveis de diversidade genética poderiam ajudar uma população a se estabelecer, aumentando as chances de alguns indivíduos suportarem as novas condições, ou permitindo uma utilização mais eficiente ou mais completa dos recursos. Estudos de espécies em seus habitats nativos e novos habitats estão de acordo com esta premissa (Hughes et al., 2008).

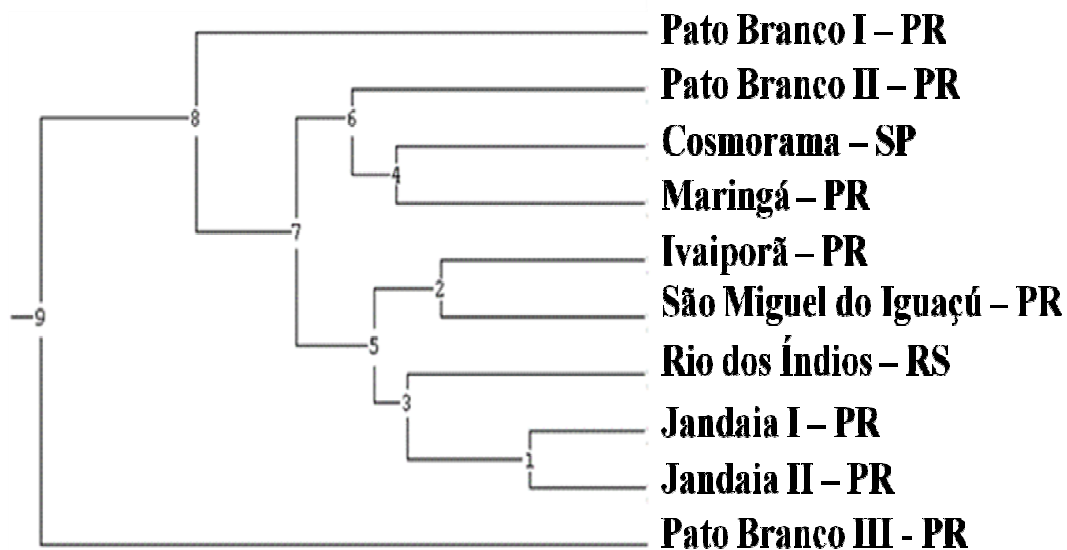


Figura 8 - Dendrograma da distância genética entre as amostras de plantas de *Euphorbia heterophylla* coletadas em 10 localidades. A estimativa foi realizada utilizando o método UPGMA empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999). **ALTERE A LETRA DO QUADRO PARA ARIAL**

Crawford e Whitney (2010) introduziram genótipos divergentes de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) originados de várias localidades, para verificar se a diversidade genética pode afetar a capacidade de uma espécie colonizar um novo ambiente. Esses autores observaram que o aumento da diversidade genética aumentou o sucesso da colonização, medido em índices de emergência de mudas, produção de biomassa, duração da floração e reprodução. Os referidos pesquisadores concluíram também que a contribuição para o sucesso da colonização foi determinado pelo genótipo individual e pelas interações positivas entre os genótipos, mas que a densidade de plantas não teve efeito sobre o sucesso da colonização. Por isso, Crawford e Whitney (2010) alertaram que a diversidade genética associada à capacidade elevada das populações para colonizar novos habitats pode ter implicações importantes para prever e controlar invasões biológicas. Desta forma, as amostras de leiteiro analisadas no presente estudo, apresentando diversidade genética alta em nível molecular, podem ser de populações fundadoras decorrentes de um evento de colonização por poucos indivíduos, que representam (cada uma delas) frações da variação genotípica da espécie, criando um gargalo populacional em cada novo *habitat* colonizado, com prevalência de genótipos específicos em cada local, de modo que cada população contém marcadores ISSR diferenciados e formam populações geneticamente estruturadas.

Para definir se o efeito de gargalo genético, aliado ao potencial colonizador de *E. heterophylla*, ou se aplicações diferenciadas de herbicidas são determinantes na formação de populações geneticamente estruturadas, será necessário planejar experimentos, expondo amostras da espécie a tipos e/ou doses diferentes de herbicidas. Este procedimento permitirá avaliar se ocorre seleção de marcadores específicos e diferenciados de ISSR. Os nove marcadores ISSR identificados no presente estudo (ISSR-2, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-17, ISSR-18, ISSR-19, ISSR-811) poderão ser usados para monitorar efeitos de tipos e/ou doses diferentes de herbicidas sobre o genoma de leiteiro e também podem ser úteis para avaliar fatores determinantes ou não da estrutura de populações de *E. heterophylla*.

No presente estudo, os marcadores ISSR foram importantes para indicar uma diversidade genética alta dentro das populações de *E. heterophylla* analisadas e para mostrar uma alta divergência genética em nível molecular

entre as populações de uma mesma região ou de regiões diferentes. Tais evidências são informações adicionais que poderão ser conjugadas com os demais fatores norteadores usados para o manejo e controle de infestação desta espécie. Populações geneticamente estruturadas em nível molecular podem requerer programas de manejo e controle particulares e diferenciais para cada local.

5. CONCLUSÕES

Para a obtenção de melhores resultados utilizando marcadores ISSR (*inter-simple sequence repeats*), é importante que se realize investimentos para padronizar as reações de amplificações. As concentrações de *primer*, cloreto de magnésio e nucleotídeos, bem como os parâmetros cíclicos de temperatura e outros componentes da reação de amplificação, devem ser padronizados, pois influenciam drasticamente tanto no número como na natureza dos produtos de amplificação.

Euphorbia heterophylla apresenta-se como um exemplo de espécie cuja diversidade genética em nível molecular (marcadores ISSR; *inter-simple sequence repeats*) é alta, dentro e entre amostras de populações da espécie.

Estratégias de controle diferenciadas é um procedimento indicado dentro de cada área e para diferentes áreas de infestação por *Euphorbia heterophylla*, devido à alta diversidade genética verificada em sequencias de DNA entre locos de sequencias simples repetidas (ISSR) em cada amostra de populações da espécie.

Valores altos para o polimorfismo em nível molecular em amostras de *Euphorbia heterophylla* podem representar um dos fatores que contribuem diretamente para o potencial invasivo da espécie.

O efeito fundador característico de espécies invasoras não reduziu a diversidade genética em nível molecular (regiões de ISSR) da espécie *Euphorbia heterophylla*, como é indicado pelo polimorfismo alto verificado nas amostras de populações desta espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUBUE, P.I.; MITTAL, G.C.; AGUWA, C.N. Preliminary Pharmacological Study of Some Nigerian Medical Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 8:53-63,1983.

ALLEM, A.C. Notas taxonômicas sobre tribos Phyllanthae, Delechampae e Manihoteae (Euphorbiaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, 22:3-15, 1975.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Massachusetts: Blackwell Publishing Maden, 2007. 642p.

BACCHI, E.M. Farmacognosia de algumas espécies de *Phyllanthus* (conhecidas como quebra pedra). **Farmácia e Química**, 24:39-40, 1984.

BANNON, J.S.; BAKER, J.B.; ROGERS, R.L. Germination of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*). **Weed Science**, 26:221-225, 1978.

BARRET, S.C.H. Genetics and evolution of agricultural weeds. In: ALTIERI, M.A.; LIEBMAN, M. (eds.). **Weed Management in agroecosystems: ecological approaches**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 57-75.

BARRET, S.C.H. Genetics of weed invasions. In: JAIN, S.K.; BOTSFORD, L.W. (eds). **Applied Population Biology**. Amsterdã: Brookmetrix, 1992. p. 91-119.

BARRETO, R.W.; EVANS, H.C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. Hirta* Imprensa Universitária, in Brasil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, 141:21-36, 1998.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1984. 377p.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 415p.

BASLER, E.; TODD, G.W.; MEYER, R.E. Effects of moisture stress on absorption, translocation and distribution of 2,4-dichlorophenoxyacet acid in bean plants. **Plant Physiology**, 36:573-579, 1961.

BIESBOER, D.D.; MAHLBERG, P.G. A comparison of alpha-amylases from the latex of three selected species of Euphorbia (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, 68:498-506, 1981.

BORGO, A.; ROSITO, C. Resultados da Aplicação de herbicidas para o controle de *Euphorbia heterophylla* na Cultura de Soja. In: 12º SEMINÁRIO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E ERVAS DANINHAS, Fortaleza, 1978. **Resumos...** Fortaleza: SBHED, 1978. p. 95.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, 19:209–215, 2001.

BOYDSTON, R.A. Soil water content affects the activity of four herbicides on green foxtail. **Weed Science**, 38:578-582, 1990.

BRIDGES, D.C.; BRICK, B.J.; BARBAUS, J.C. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) interference with peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Technology**, 40:37-42, 1992.

BRIGHENTI, A.M.; OLIVEIRA, M.F. Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 1-36.

BURNSIDE, O.C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technology**, 6:621-625, 1992.

CAETANO-ANOLLÉS, G. Amplifying DNA with Arbitrary Oligonucleotide Primers. **PCR Methods And Applications**, 3:85–94, 1993.

CARVALHO, V.M.; MARQUES, R.M.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 26:195-198, 2010.

CHASE, J.M. Stochastic community assembly causes higher biodiversity in more productive environments. **Science**, 328:1388-1391, 2011.

CHEMALE, V.M.; FLECK, N.G. Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em competição com *Euphorbia heterophylla* L. sob três densidades e dois períodos de ocorrência. **Planta Daninha**, 5:36-45, 1982.

COBUCCI, T.; DI STEFANO, J.G.; KLUTHCOUSKI, J. **Manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro em plantio direto**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e feijão, 1999. 35p. (Circular Técnica).

COSTA, O.M.M. Morfologia e desenvolvimento de *Euphorbia heterophylla*. **Agricola Sul Riograndense**, 18:59-66, 1982.

CRAWFORD, K.M.; WHITNEY, K.D. Population genetic diversity influences colonization success. **Molecular Ecology**, 19:1253–1263, 2010.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University 1981. 482p.

DARLING, M.S. Epidermis and hypodermis of the saguaro cactus (*Cereus giganteus*): anatomy and spectral properties. **American Journal of Botany**, 76:1698-1706, 2007.

DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas: Fundamentos**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 431p.

DINELLI, G.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; MAROTTI, I.; CATIZONE, P.; MAZZANTI, A. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Ecotypes. **Food Chemistry**, 99:105-114, 2004.

DLUGOSCH, K.M.; PARKER, I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. **Molecular Ecology**, 17:431-449, 2008.

ENEMADUKU, A.M.; YAHAYA, D.S.; ALIM, S.; SAMUEL, A. **International Journal of Reserch in Ayurveda e Pharmacy**, 2:1214-1217, 2011.

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

FERREIRA, E.A. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil IV: *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, 21:263-271, 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FORNAROLLI, D.A.; MORAES, V.J.; CAETANO, E. Alternativas de controle para *Euphorbia heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da ALS em diferentes densidades populacionais. In: XXIII CBCPD Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. Gramado, 2002. **Resumos Expandidos...** Gramado: SBCPD. 2002. p. 135-137.

FRIGO, M.J.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA, R.S.JR.; MACHADO, M.F.P.S. Polimorfismo de Esterases para Análise de Diversidade Genética e Estrutura de Populações de *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae). **Weed Research**, 57:54-60, 2009.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: SBG, 1992. 631p.

GARRIDO, L.R.; DHINGRA, O.D. Weed Species as potential reservoir hosts of *Diaphorte phaseolorum* f.sp. meridionalis. **Fitopatologia Brasileira**, 22:108-110,1997.

GAZZIERO, D.L.P.; BRIGHENTI, A.M.; MACIEL, C.D.G.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; ADEGAS, F.S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, 16:117-125, 1998.

GAZZIERO, D.L.P.; FLECK, N.G. Efeitos de três herbicidas pós-emergentes aplicados em diferentes horas do dia sobre ervas daninhas e plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Planta Daninha**, 3:23-28, 1980.

GAZZIERO, D.L.P.; MACIEL, C.D.G.; SOUZA, R.T.; VELIN, E.D. PRETE, C.E.C.; OLIVEIRA NETO, W. Avaliação da eficiência e seletividade do herbicida glyphosate aplicado na cultivar BR-16RR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, p. 398. 1998a.

GENG, L.X.; ZHANG, S.; ZHENG, R.J. LEGERSKI. Artemis links ATM to G2/M checkpoint recovery via regulation of Cdk1-cyclin B. *Mol. Cell Biology*, 27:2625–2635.

GENTON, B.J.; JONOT, O.; THÉVENET, D. Isolation of five polymorphic microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the invasive weed *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae). **Molecular Ecology Notes**, 5:381–383, 2005.

GOVINDARAJU, D.R. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. **Evolutionary Biology**, 2:173-181, 1989.

GÓMEZ, C.; ESPADALER, X. Seed dispersal curve of a Mediterranean myrmecochore: Influence of ant size and the distance to nests. **Ecological Research**, 13:347-352, 1998.

GROMBONE-GUARANTINI, M.T.; RODRIGUES, R.R. Seed bank seed rain in seasonal semi deciduos forest in south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, 18:759-774, 2005.

HARPER, J.L. The evolution of weeds in relation to resistance to herbicides. **British Crop Protection Conference**, 1:179-188, 1956.

HEAP, I. **International survey of herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 03, julho, 2014.

HESS, F.D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, 48:160-170, 1994.

HILTON, H.W. Herbicide tolerant strains of weeds. **HSCPA Annual Report**, 1.66-66, 1957.

HOLM, L.; DOLL, J.; HOLM, E.; PANCHI, J.; HERBERGER, J. *Conyza canadensis* (L.) Cronq. (syn. *Erigeron canadensis* L.). **World weeds: natural histories and distributions**. Toronto: John Wiley and Sons, 1997. p. 226-235.

HOLT, J.S.; LEBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed Technology**, 4:141-149, 2005.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. Mexico: CIMMYT, 1994. 566p.

HUANGFU, C.H.; SONG, X.L.; QIANG S. ISSR variation within and among wild *Brassica juncea* populations: implication for herbicide resistance evolution. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 56:913-924, 2009.

HUGHES, A.R.; BYRNES, J.E.; KIMBRO, D.L.; STACHOWICZ, J.J. Reciprocal relationships and potential feedbacks between biodiversity and disturbance. **Ecology Letters**, 10:849-864, 2008.

HUSTON, M.A. Hidden treatments in ecological experiments: re evaluating the ecosystem function of biodiversity. **Oecologia**, 110:449-60, 1997.

INNIS, A.F.; FORSETH, I.N.; WHIGHAM, D.F. Genetic diversity in the invasive *Rubus phoenicolasius* as compared to the native *Rubus argutus* using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Biological Invasions**, 13:1735-1738, 2011.

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA USP - <http://www.ib.usp.br/evosite/evo101/IIID3Bottlenecks.shtml>. Acesso em: 20, agosto, 2014.

JIN, H.; YE, S. The species composition and diversity of phytoplankton in Nanji Island. **National Nature Reserve**, 14:206-215, 2006.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. 777p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 1992. 789p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf, 1997. 798p.

KOLBE, J.J.; GLOR, R.E.; RODRIGUEZ-SCHETTINO, L.; CHAMIZO-LARA, A.; LARSON, A.; LOSOS, J.B. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. **Nature**, 431:177–181, 2004.

LEE, C.E. Evolutionary genetics of invasive species. **Trends in Ecology & Evolution**, 17:386-391, 2002.

LEVENE, B.C.; OWEN, M.D.K. Effect of moisture stress and leaf age on bentazon absorption in common cocklebur (*Xanthium strumarium*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Weed Science**, 43:7-12, 1995.

LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, 6:381-392, 1972.

LOREAU, M.; HECTOR, A. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. **Nature**, 412, 72–76, 2001.

LORENZI, H.J. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: Plantarum, 1991. 440p.

LORENZI, H.J. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: São Paulo, 2000. 608p.

MACHADO, S.L.O. **Eficiência e seletividade de imazethapyr, aplicado em duas épocas, no controle de plantas daninhas em soja**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1982. 12p.

MAKI, C.S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Piracicaba: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010. 128p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

MATTIELO, R.R.; RONZELI JÚNIOR, P.; PURÍSSIMO, C. Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agronômicos e genéticos. In: CURSO DE MANEJO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS. Ponta Grossa, 1999. **Resumos...** Ponta Grossa: AECG - Associação dos Agrônomos de Ponta Grossa , 1999. p. 27-40.

McROBERTS, R.E.; TOMPPPO, E.O.; FINLEY, A.O.; HEIKKINEN, J. Estimating areal means and variances of forest attributes using the k-Nearest Neighbors technique and satellite imagery. **Remote Sensing of Environment**, 111:466 - 480, 2005.

MOORE, R.C.; ALLEN, J.F.; HENDLER, J.; TATE, A. A formal theory of knowledge and action. In: ALLEN, J.F.; HENDLER, J.; TATE, A. **Readings in Planning**. San Mateo: Morgan Kaufmann Publishers, 1990. p. 480-519.

MUZIK, T.J. **Weed biology and control**. New York: McGraw-Hill Book Company. 1970. 273p.

NARBONA, E.; ARISTA, M.; ORTIZ, P.L. Explosive seed dispersal in two perennial mediterranean Euphorbia species (Euphorbiaceae). **American Journal Of Botany**, 92:510-516, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Predicting Invasions of Nonindigenous plants and plant pests. **D.C. National Academy**. Washington: Hardcover. 2002. 198p.

NEI, M.; FELDMAN, M. W. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, 3:460-465, 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. **Biological Sciences**, 12:3321-3323, 1973.

NISSEN, P.; HANSEN, J.; BAN, N.; MOORE, P.B.; STEITZ, T.A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. **Science**, 289:920–930, 1992.

NOVAK, S.J.; MACK, R.N. Genetic bottlenecks in alien plant species: influence of mating systems and introduction dynamics. In: SAX, D.F.; GAINES, S.D.; STACHOWICZ, J.J. (eds.). **Exotic species - bane to conservation and boon to understanding: ecology, evolution and biogeography**. Massachusetts: Sinauer, 2005. p. 95-122.

O'HANLON, P.C.; PEAKALL, R.; BRIESE, D.T. AFLP reveals introgression in weedy *Onopordum thistles*: hybridisation and invasion. **Molecular Ecology**, 8:1239-1246, 1999.

OKUNO, K.; EBANA, K.; NOOV, B.; YOSHIDA, H. Genetic diversity of central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. **Genetics Resource and Crop Evolution**, 45:289-394, 1998.

OWEN, M.D.K. World maize/soybean herbicide resistance. In: POWLES, S.B.; SHANER, D.L. **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 101-164.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenALEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6:288-295, 2012.

PEREGOY, R.; KITCHEN, L.M.; JORDAN, W.P.; GRIFFIN, L.J. Moisture stress effects on the absorption, translocation, and metabolism of haloxyfop in johnsongrass (*Sorghum halepense*) and large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Weed Science**, 38:331-337, 1990.

PESTER, T.A.M.R.; NAGHAVI, M.R.; AGHAEI, M.J.A.R.; TALEEI, A.R.; OMIDI, M.; MOZAFARI, J.; HASSANI, M.E. Genetic diversity of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) determined with RAPD and AFLP markers. **Weed Science**, 51:287-293, 2003.

PINTO, S.B.; PANIZZI, A.R. Performance of nymphal and adult *Euschistus heros* (F.) on milkweed and on soybean and effect of food switch on adult survivorship, reproduction and weight gain. An. **Sociedade Entomológica do Brasil**, 23:549-555, 1994.

PITELLI, R.A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, 11:16-27, 1985.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, 4:1-24, 1987.

PITELLI, R.A.; DURIGAN, J.C. Terminologia para períodos de convivência de plantas daninhas em culturas anuais e bianuais. In: 15 CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS. Piracicaba, 1992. **Resumos...** Piracicaba: SBHED, 1992. p. 37,1992.

PONCHIO, J.A.R. **Resistência de Bidens pilosa L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase**. Piracicaba: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1997. 138p. Tese (Doutorado em Agronomia).

PULLANDRE N.; SAMADI S.; BOISSELIER M.C.; SYSOEV A.V.; KANTOR Y.I.; CRUAUD C.; COULOUX A.; BOUCHET P. Starting to unravel the toxoglossan knot: molecular phylogeny of the 'turrids' (Neogastropoda: Conoidea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 47:1122-1134, 2008.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959, 2000.

RADOSEVICH, S.; HELT J.; GHERSA C. **Weed ecology: implications of management**. New York: Inderjit, 1997. 588p.

REDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, 128:9-17, 2002.

RODRIGUES, J.F.; ALMEIDA, S. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo Cattleya coccínea Lindl. e C. Mantiqueirae (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Cidade: ESALQ/USP, 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

RUEDELL, J. **Plantio direto na região de Cruz Alta**. Cruz Alta: Fundação Centro de Experimentação e Pesquisa Fecotrigo, 1995. 134p.

ROWE, M.L.; LEE, D.J.; BOWDITCH, B.M.; MASTERS, R.A. Genetic variation in North American leafy spurge (*Euphorbia esula*) determined by DNA markers. **Weed Science**, 45:446-454, 1997.

ROBINSON, J. The Oxford Companion to Wine. Hardcover: **Oxford University Press**, 1998. 840p.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIBEIRO, M.C.F. Efeito do teor de umidade do solo na seletividade e na eficiência de carfentrazone-ethyl no controle de plantas daninhas na cultura da soja. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 2015. Disponível em: http://www.upf.br/rherbicidas/download/RBH_carfentrazone.pdf. Acesso em: 19, setembro, 2014.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239:487-491, 1988.

SAKAI, T.; WADA, T.; ISHIGURO, S.; OKADA, K. RPT2: A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. **Plant Cell Culture and Micropopagation**, 12:225-236, 2001.

SILVA, S.I.; SALATINO, A. Fatty acids composition and potential use of some seed oil of the Euphorbiaceae In: XVI INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS. Saint Louis, 1999. **Proceedings...** Sant Louis: Dry Forest (Brasil), 1999. p. 687-688.

SUDA, C.N.K. Sementes de *Euphorbia heterophylla* L.: **Ocorrência de polimorfismo e controle da germinação**. Campinas: Unicamp - Instituto de Biologia, 1991. 96p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal).

SUDA, C.N.K. **Hidrolases da parede celular em sementes de Euphorbia heterophylla L. durante a germinação e desenvolvimento da plântula**. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001. 147p. (Doutorado em Agronomia).

SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12:226-245, 2000.

SUDA, C.N.K.; PEREIRA, M.F.D.A. Sensibilidade à luz de sementes de *Euphorbia heterophylla* L. Durante a Germinação. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, 9:61-66, 1997.

ŠTEFÚNOVÁ, K.; BEŽOVÁ, K.V.; TÓTHOVÁ, J.R. DNA polymorfizmus inbreednej populácie brojlerových králikov. In: XX **GENETICKÉ DNY**. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2014. p. 94-96. ISBN 80-7157-607-7.

SUN, M. Populations genetic structure of yellow sturthistle (*Centaurea solstitialis*) a colonizing weed in the western United States. **Canadian Journal of Botany**, 75:1470-1478, 1997.

SWITZER, C.M. The existence of 2,4-D resistant strains of wild carrot (*Daucus carota*). In: MEETING OF THE NEWS, 11., 1957. **Proceedings...** Washington: News, 1957. p. 315-318.

TANAHARA, A.; MAKI, M. Genetic diversity and population genetic differentiation in the endangered annual weed, *Bidens cernua* (Compositae), and two common congeners in Japan. **Weed Biology and Management**, 10:113-119, 2010.

TREZZI, M.M. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal and Environmental Science and Health - Part B**, 40:101-109, 2005.

VAN DRIESCHE, R.G.V.; BELLOWS, T.S. Biology of arthropod parasitoids and predators. In: VAN DRIESCHE, R.G.V.; BELLOWS, T.S. (eds.). **Biological Control**. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 309-35.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A.A. Técnica de Cruzamentos Controlados em *Euphorbia heterophylla* L. **Bragantia**, 58:23-27, 2001.

VARGAS, L.; SILVA, A.A.; BORÉM, A.; OLIVEIRA, S.P. **Identificação e manejo de plantas daninhas resistentes a herbicidas**. Viçosa: Jard, 1999. 39p.

VASCONCELOS, M.J.V.; ABDELNOOR, R.V.; KARAN, D.; ALMEIDA, A.M.R.; OLIVEIRA M.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Variabilidade genética em biótipos de leiteiro de Londrina, PR. **Planta Daninha**, 18:285-291, 2000.

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

VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. Inibidores da polimerização de tubulina. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JÚNIOR, A. (eds.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 1997. p. 131-137.

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

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

WALDSCHMIDT, A.M.; MARCO-JÚNIOR, P.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A. O. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, 62:923-928, 2002.

WANG, H.; KESINGER, J.W.; ZHOU, Q.; WREN, J.D.; MARTIN, G.; TURNER, S.; TANG, Y.; FRANK, M.B.; CENTOLA, M. Identification and characterization of zebrafish ocular formation genes. **Genome**, 51:222-235, 2008.

WARWICK, S.I. Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, 56:797-806, 1990.

WHITNEY, K.D.; GABLER, C.A. Rapid evolution in induced species, 'invasive traits' and recipient communities: challenges for predicting invasive potential. **Diversity and Distributions**, 14:569-580, 2010.

WILLARD, T.S.; GRIFFIN, J.L. Soybean (*Glicine max*) yield and quality responses associated with wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. **Weed Technology**, 7:118-122, 1993.

WILSON, A.K. *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. **Tropical Pest Management**, 27:32-38, 1981.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 70:21-24, 2002.

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

WOLFE, K.H. Evolutionary genomics: yeasts accelerate beyond BLAST. **Current Biology**, 14:R392–R394, 2005.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of population. **Science Report**, C 4:79-103, 1978.

YANG, C.M. *Euphorbia thymifolia* suppresses herpes simplex virus-2 infection by directly inactivating virus infectivity. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**, 32:346-349, 2012.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Alberta: University of Alberta; Center for International Forestry Research, 1999. 29p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176-183, 1994.