

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

BRUNO CESAR CIRCUNVIS

**Uso de isoenzimas para caracterização genética de amostras de *Conyza*
sp. do estado do Paraná**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JUNHO – 2012**

BRUNO CESAR CIRCUNVIS

**Uso de isoenzimas para caracterização genética de amostras de *Conyza*
sp. do estado do Paraná**

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.

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JUNHO – 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA
É ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UEM E DEVERÁ SER
IMPRESSA NO VERSO DA FOLHA DE ROSTO, OU SEJA, NO VERSO DA
FOLHA ANTERIOR.

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

A large empty rectangular box with a thin black border, intended for the CIP data. It is positioned centrally below the text.

À minha família, pelo apoio e paciência que tiveram comigo, principalmente nos momentos mais difíceis, sendo fonte inspiradora de luta e generosidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aparecido Dourival Circunvis e Edina Marchesoni, pela consideração, estrutura familiar e apoio em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela estrutura física e humana oferecida para a conclusão deste trabalho.

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

Ao professor doutor Erasmo Renesto, pela valiosa orientação, pela amizade, pelo excelente bom humor, paciência e compreensão.

Às professoras doutora Claudete Aparecida Mangolin, doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado e doutora Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela Coorientação.

A todos os colegas, funcionários e professores do Laboratório de Genética Animal, do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal, pelo companheirismo no dia-a-dia e por todos os favores prestados.

Aos amigos, Henrique Bueno Ruiz, Danielle das Neves Bessalhôk, Tiago Signorini e Rosemir Bernardo Filho, por sempre estarem ao meu lado em quase todas as atividades do Mestrado e pela amizade que perdurará até a eternidade.

A todos os alunos de Mestrado e de Doutorado ingressos no Programa ano de 2010 e a tantos outros amigos não citados. Tudo em minha vida ficou mais fácil quando eu me lembrava de que não estava sozinho. Obrigado a todos.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”

(Louis Pasteur)

BIOGRAFIA

BRUNO CESAR CIRCUNVIS, filho de Aparecido Dourival Circunvis e de Edina Marchesoni, nasceu, no dia 25 de fevereiro de 1985, na cidade de Maringá, estado do Paraná.

No ano de 1992, iniciou o Ensino Fundamental na Escola São Francisco de Assis, na cidade de Mandaguaçu, estado do Paraná, finalizando esta etapa no ano de 1999.

O Ensino Médio cursou no Colégio Estadual Oberon Floriano Dittert, localizado na cidade de Maringá, estado do Paraná, no período compreendido entre 2000 e 2003.

Concluiu o Curso Licenciatura em Ciências Biológicas, na Faculdade Ingá (Uningá), no ano de 2007.

Em 2009, concluiu o curso de especialização em Biotecnologia Aplicada à Agroindústria, com linha de pesquisa em Mutagenicidade Citotóxica em Afluentes Causados por Herbicidas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Em 2010, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, com a linha de pesquisa Variabilidade Genética de Populações Naturais, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Genética Vegetal.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Família asteraceae.....	4
2.2. Gênero <i>Conyza</i>	4
2.3. Eletroforese de isozimas.....	10
2.4. Variabilidade genética em plantas daninhas.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Análise dos dados.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Solução de extração utilizada para extrair as isozimas de brotos de folhas de <i>Conyza</i> sp.....	16
Quadro 2 – Nome, número de comissão de enzima (n ^o . E.C.) e estrutura. quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido.....	19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Exemplares de *Conyza* sp. observadas em seus diferentes estágios de desenvolvimento.....9
- Figura 2 – Mapa de localização dos municípios do estado do Paraná, onde foram coletados os acessos de *Conyza* sp.....17
- Figura 3 – Plântulas de *Conyza* sp. germinadas em pequenos vasos com areia e substrato comercial à base de turfa mantida em casas de vegetação....18
- Figura 4 – Zimograma representado o padrão de bandas dos 4 sistemas isoenzimáticos analisados em gel de amido, com os seus respectivos locos presentes nas populações (P1: população do município de Astorga; P2: população do município de Guarapuava; P3: população do município de Nova Esperança. Todas do estado do Paraná).....21

RESUMO

CIRCUNVIS, Bruno Cesar, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, junho de 2012. **Uso de isozimas para a caracterização genética de amostras de *Conyza* sp. no estado do Paraná - PR** . Professor orientador: Erasmo Renesto. Professores conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

Crescentes estudos vêm sendo desenvolvidos para a análise da diversidade genética de espécies *Conyza bonariensis* L., *Conyza canadensis* L. e *Conyza sumatrensis* Retz., popularmente conhecidas como buva ou voadeira, pertencentes à família Asteraceae, que nos últimos anos vem causando vários prejuízos nas lavouras do Brasil e do mundo, principalmente nas plantações de soja. Assim sendo, a variabilidade genética de três populações de *Conyza* sp., provenientes do noroeste do estado do Paraná, foi estimada pela técnica de eletroforese de isozimas em gel de amido. Foram resolvidos apenas quatro sistemas isoenzimáticos (ACP, GPI, MDH e PGM) e detectados 10 locos e 10 alelos, os quais não apresentaram diversidade genética dentro e entre as populações analisadas, comprovada pela presença de apenas indivíduos homozigotos. As enzimas utilizadas no presente estudo indicaram que as três populações são geneticamente uniformes para os sistemas enzimáticos analisados.

Palavras-chave: isozimas; *Conyza*; buva; variabilidade genética.

ABSTRACT

CIRCUNVIS, Bruno Cesar. M. Sc., Universidade Estadual de Maringá, June 2012. **Isozymes utilization for genetic characterization of of *Conyza* sp. samples from Paraná state, Brazil.** Advisor: Erasmo Renesto. Faculty advisors: Claudette Mangolin and Maria Aparecida de Fátima Pires da Silva Machado.

Increasing studies have been conducted to analyze the genetic diversity of species *Conyza bonariensis* L., *Conyza canadensis* L. and *Conyza sumatrensis* Retz., popularly known as horseweed or motorboat belonging to the Asteraceae family in recent years has caused damage in several crops in Brazil and the world, mainly in soy. Thus, the genetic variability of three populations of *Conyza* sp. from the northwestern state of Paraná was estimated by isozymes electrophoresis of in starch gel. Were resolved only four isoenzymatic systems (ACP, GPI, MDH and PGM). We detected 10 loci and 10 alleles, which showed no genetic diversity within and among populations analyzed, demonstrated by the presence of only homozygous. Enzymes used in this study indicated that the three populations are genetically uniform for the enzyme systems analyzed.

Key words: isozymes; fleabane; *Conyza*; genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de genética de populações de plantas estabelece uma ligação entre a biologia molecular e biologia evolutiva e fornece a base para o entendimento de adaptações ambientais e a base teórica para o melhoramento de plantas cultivadas (Hamrick et al., 1990). O foco principal dos geneticistas de populações tem sido o estudo de variação genética em populações naturais, uma vez que o potencial para modificação evolutiva depende da existência de variabilidade genética.

Crescentes estudos vêm sendo desenvolvidos para a análise da diversidade genética de espécies *Conyza bonariensis* L., *Conyza canadensis* L. e *Conyza sumatrensis* Retz., popularmente conhecidas como buva ou voadeira, pertencentes à família Asteraceae, com centro de dispersão nas Américas do Sul e Norte, respectivamente. *C. bonariensis* ocorre intensamente nas zonas subtropicais e temperadas da América do Sul (Kissmann e Groth, 1999), enquanto *C. canadensis* é uma das espécies mais distribuídas do mundo, principalmente nas regiões de clima temperado ou subtropical do hemisfério norte e nas regiões subtropicais do hemisfério sul (Holm et al., 1997). *C. sumatrensis* é uma planta perene anual ou de curta duração, que pode atingir até 3 m de altura, normalmente cerca de 1-1,5 m. É originada da região subtropical da América do Sul, porém tem se espalhado rapidamente por toda a Europa Ocidental e ao redor da bacia do Mediterrâneo.

A produção média por planta é de 110 mil aquênios (sementes) para *C. bonariensis* (Lazaroto et al., 2008) e de 200 mil para *C. canadensis* (Bhowmik e Bekech, 1993), e 80% das sementes germinam próximo à planta-mãe (Loux et al., 2006).

Portanto, em áreas infestadas o controle é difícil e muitas vezes ineficaz. Em termos mundiais, estas espécies daninhas infestam mais de 40 culturas (Holm et al., 1997).

Nos últimos anos, a buva vem causando vários prejuízos nas lavouras do Brasil, principalmente nas plantações de soja. Relatou-se que *C. canadensis*, na densidade de 150 plantas m², reduziu em 83% a produtividade de soja cultivada em semeadura direta (Bruce e Kells, 1990).

Além disso, o surgimento de indivíduos resistentes ao princípio ativo Glifosato, antes considerado o único detentor do poder de controle, torna o controle ainda mais difícil. O primeiro relato de resistência de *C. canadensis* ocorreu em Delaware (USA), em 2000, (VanGessel, 2001) e em 2007 biótipos resistentes também foram encontrados no Brasil e na China (Heap, 2009); o mesmo ocorreu com *C. bonariensis* em áreas de soja transgênica (Vargas et al.,2006; Vidal, 2007).

O uso da análise de isozimas como marcador molecular vem sendo utilizado desde a década de 1960 (Mcmillin, 1983), cuja técnica baseia-se na premissa de que diferenças na sua mobilidade em um campo elétrico são resultados de diferenças nas sequências de DNA que codificam sua sequência de aminoácidos e que essas diferenças são geneticamente herdáveis, uma vez que apresentam modificações na sequência de DNA que as codificam.

O processo de eletroforese baseia-se na separação de moléculas de mesma natureza química, de acordo com seus respectivos pesos moleculares ou cargas elétricas, utilizando-se de um campo elétrico, desenvolvido por Smithies (1955), que é ainda amplamente usado em estudos de populações, com finalidade de quantificar a variação genética de um modo geral (Loomis, 1974; Wendel e Weeden, 1989; Kephart, 1990;)

Como apresenta uma característica de codominância e possui penetrância completa, estes marcadores são utilizados frequentemente e com grande êxito na análise de variabilidade genética de populações naturais, para estimar os níveis e entender a variabilidade genética dentro e entre populações; estudar o fluxo gênico entre populações e processos de hibridização natural, como a dispersão de espécies e filogenias; e até mesmo podendo ser utilizados para avaliações fisiológicas dos organismos.

Mesmo tendo começado pesquisas nesta área na década de 1960, o número de estudos do controle gênico de isozimas em plantas ainda é pequeno em comparação ao de animais. O fato é que existem alguns problemas relacionados com a extração de proteínas, pois elas podem ser inativadas em função da liberação de substâncias fenólicas e a produção de quinonas, impossibilitando, desta forma, sua visualização no gel (Wendel e Weeden, 1989). Portanto, durante o isolamento da enzima de plantas, existe a necessidade de remoção destes compostos fenólicos e de outros produtos secundários tão rápido quanto possível, adicionando agentes

absorventes ou protetores, que possam competir e inativar a ação destas substâncias, evitando a oxidação realizada pelos fenóis.

Embora ainda haja dificuldades para a extração de isoenzimas de vegetais, a técnica tem sido aplicada com sucesso para a classificação taxonômica de várias famílias (Crawford, 1989; Thébaud e Abbott, 1995).

Assim sendo, o objetivo do nosso estudo foi estimar a variabilidade genética de *Conyza sumatrensis* proveniente do noroeste do estado do Paraná, dentro de cada população e entre populações diferentes, visando à comparação de variabilidade genética entre as populações de *Conyza sp*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Asteraceae

Asteraceae é a maior família de angiospermas, constituída de ervas perenes, subarbustos e arbustos, mas ocorrem também ervas anuais, lianas e árvores (Mondin, 2006).

Devido ao seu extraordinário poder de adaptação ambiental, podem ser encontradas nos mais diversos habitats e em variadas condições climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais e até temperadas. Um dos fatores importantes para seu sucesso biológico, deve-se à sua grande capacidade de dispersão devido à presença de sementes com pápus plumosos, apêndices e estruturas de aderência (Venable e Levin, 1983).

Na América do Sul, encontra-se cerca de 20% da flora de algumas regiões Andinas e da Patagônia, enquanto na região Amazônica seu número é insignificante (Barroso, 1991).

Para o Brasil, Mondin (2006) citou a ocorrência de 262 gêneros pertencentes a 14 tribos, o que corresponde a cerca de 15% dos gêneros da família e 80% das tribos aqui consideradas. A flora asterológica do sul do Brasil é considerada bastante densa, de alta diversidade específica e com tendência à melhor representatividade das tribos Astereae, Inuleae, Helenieae e Mutiseae, onde predominam espécies microtéricas (Matzenbacher, 2003). Um dos fatores que pode ter influenciado esta alta densidade é o fato da área ancestral da família estar vinculada à porção meridional da América do Sul, ao sul do paralelo 30° (Bremer e Gustafsson, 1997).

No Rio Grande do Sul, a família está representada em todas as diferentes espécies, sendo bastante expressiva na flora do estado. O Rio Grande do Sul possui espécies de 13 das 14 tribos que ocorrem no Brasil, demonstrando ser importante centro de riqueza genética.

2.2. Gênero *Conyza*

O gênero *Conyza* inclui, aproximadamente, 50 espécies, as quais se distribuem em quase todo o mundo (Kissmann e Groth, 1999). As espécies que mais

se destacam, por seu caráter negativo, são *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* e *Conyza sumatrensis*.

Conyza bonariensis é nativa da América do Sul e ocorre de forma abundante na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil. Neste, sua presença é mais intensa nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Ela também está presente na Colômbia e na Venezuela, onde infesta lavouras de café (Kissmann e Groth, 1999). *Conyza canadensis*, porém, é nativa da América do Norte (Frankton e Mulligan, 1987), sendo uma das espécies mais amplamente distribuídas no mundo (Thébaud e Abbott, 1995).

C. sumatrensis (antes possuía as nomenclaturas *Erigeron sumatrensis* e *Conyza albida*) é uma planta perene anual ou de curta duração. Pode atingir até 3 m de altura, normalmente cerca de 1-1,5 m. É originada da região subtropical da América do Sul, porém tem se espalhado rapidamente por toda a Europa Ocidental e em redor da bacia do Mediterrâneo. É uma espécie hexaplóide ($2n = 54$), diferindo em nível de ploidia da *C. canadensis* diplóide e outras espécies poliplóides do gênero, indicando que ele pode ter surgido de um evento de hibridização. Thébaud e Abbot (1995) observaram que era provavelmente um aloploidia, em vez de autoploidia, possivelmente confirmando esta hipótese. No Brasil, algumas populações do estado do Paraná são resistentes ao glifosato e outras são resistentes ao clorimuron-etil e algumas ainda são resistentes aos dois, sendo por isso de difícil controle (Santos et al., 2012).

C. sumatrensis difere da *C. bonariensis*, principalmente em níveis de crescimento, sendo mais robusta e possuindo folhas mais largas serradas, geralmente com pelo menos 1 cm de largura.

Os capítulos de floração são ligeiramente menores do que as de *C. bonariensis* e possui cor acastanhada. A chave fornecida por Jauzein (1988) indica que a inflorescência é mais estreita no contorno do que a de *C. bonariensis* e os ramos secundários não excedam o primário.

Basicamente, as principais diferenças entre as espécies de *C. sumatrensis*, *C. bonariensis* e *C. canadensis* estão no formato da inflorescência e na densidade de pêlos na haste principal (Santos et al., 2012)

Curiosamente *C. sumatrensis*, possui uma importância econômica significativa, onde esta é uma fonte para um óleo essencial (Machado et al., 1995),

anotado para ter efeitos antimicrobianos e antifúngicos (Deans et al., 1992) e, assim, possíveis usos farmacêuticos.

As espécies de *Conyza* são cosmopolitas, sendo mais encontrada em zonas temperadas do hemisfério norte (Holm et al., 1997) e regiões subtropicais do hemisfério sul, mas é pouco freqüente em regiões tropicais (Kissmann e Groth, 1999). A espécie está presente em quase todas as regiões do Canadá (Rouleau e Lamoureux, 1992), Estados Unidos (Lazaroto et al., 2008), oeste da Europa e Planície Mediterrânea (Thébaud e Abbott, 1995), Austrália e Japão (Holm et al. 1997). No Brasil, sua presença é significativa em campos nativos e em lavouras, especialmente da região Sul (Kissmann e Groth, 1999).

As espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*, conhecidas popularmente por “buvas”, destacam-se por infestarem áreas abandonadas (terrenos baldios e margens de estradas), pastagens, culturas perenes (citros e café) e lavouras anuais (algodão, milho, soja e trigo) (Thébaud e Abbott, 1995).

É de grande importância a identificação correta de cada espécie para que se possa traçar uma estratégia tanto de controle para tentar diminuir a seleção de biótipos resistentes através do uso repetitivo de herbicidas e identificar o mecanismo de resistência envolvido (Lazaroto et al., 2008)

As espécies de *Conyza*, segundo Thébaud et al. (1995), são autocompatíveis e aparentemente não são polinizadas por insetos, sugerindo, assim, a ocorrência de autogamia ou polinização pelo vento, por meio de adaptações nos aquênios, as quais são formados por estruturas chamadas de pápus, embora os insetos visitem as flores abertas (Smisek, 1995).

Contudo, a dispersão de sementes pode se dar por meio da água. Grandes quantidades de *Conyza canadensis* foram encontradas em canais e nas margens de canais de irrigação (Kelly e Bruns, 1975).

Por se tratarem de espécies de ciclo tipicamente anuais ou bienais, dependendo das condições de ambiente e por manterem uma ampla distribuição geográfica, sugerem uma baixíssima limitação climática. Estas espécies toleram bem condições de deficiência hídrica continuando a se reproduzirem mesmo sobre situações de estresse, fato que se deve à sua morfologia em forma de roseta que a permite fixar carbono e acumule energia. Suas sementes germinam sob condições de solos com alto teor de salinidade e de pH neutro para alcalino (Regher e Bazzar, 1979; Nandula et al., 2006).

Suas sementes não apresentam dormência e podem germinar sempre em condições de temperatura e umidade favoráveis, germinado em temperaturas de 13°C para *C. canadensis* e mínima 35 °C e 42 °C máxima para *C. bonariensis* (Lazaroto, 2008 apud Rollin e Tan, 2006).

A maturação das sementes acontece três semanas após a fertilização e o número médio de semente por capítulo por planta em *C. canadensis* varia de 60 a 70, enquanto em *C. bonariensis* varia de 190 a 550, com média de 400 sementes por capítulo, dependendo da altura do caule. Aproximadamente 80 % destas sementes germinam próxima à planta mãe (Loux, 2009; Regehr e Bazzar, 1979; Smisek, 1995).

Utilizando o herbicida paraquat em plantas resistentes, Smisek (1995) verificou que o nível de autocruzamento dentro de uma população de *C. canadensis* foi de 4% aproximadamente e relatou ocorrer uma hibridização entre espécies *C. canadensis* e outras do gênero *Conyza*, principalmente a *C. summatrensis*. Porém, *C. canadensis* é diploide, com número de cromossomos $2n=18$, enquanto as outras espécies do gênero são poliploides (Thébaud e Abbott, 1995).

Em termos mundiais, estas espécies daninhas infestam mais de 40 culturas (Holm et al., 1997). Relatou-se que *C. canadensis*, na densidade de 150 plantas m^{-2} , reduziu em 83% a produtividade de soja cultivada em semeadura direta (Bruce e Kells, 1990). Em beterraba-açucareira, *C. canadensis* diminuiu a produtividade em 64% na média de dois anos e, também, inibiu o desenvolvimento de ramos novos em videira na ordem de 28% (Holm et al., 1997).

Em videira, a ocorrência de *Conyza* sp. dá-se, principalmente, como plantas daninhas anuais de inverno. Em cenoura e cebola, por outro lado, ela ocorre como anuais de verão, após o cultivo de inverno. Em cenoura, seus efeitos na eficiência de colheita são mais prejudiciais do que na produtividade da cultura (Leroux et al. 1996), tendo em vista que os caules e os ramos secos de buva interferem na colheita mecânica de cenoura, mesmo em baixas densidades .

Atualmente, têm sido encontrados problemas em seu controle químico pela ocorrência de biótipos resistentes a herbicidas, principalmente ao glifosfato.

Métodos alternativos de controle vêm sendo pesquisados em diversos locais do Brasil e do mundo. Sabe-se que, para evitar tal problema, o mais aconselhável é a rotação no uso de herbicidas ou ainda a mistura de produtos, misturando assim princípios ativos e assegurando-se do controle.

A existência de variabilidade genética em indivíduos de uma população aumenta a chance de alguns para responder diferentemente frente a alterações do meio ambiente, de modo que isso possa garantir a preservação da espécie (Allendorf e Luikart, 2007).

Por isso, um dos fatores que deve contribuir para determinar respostas diferentes de plantas daninhas frente à aplicação de herbicidas é a variabilidade genética presente em populações das diferentes espécies.

As populações de plantas com maior diversidade genética podem se constituir num obstáculo para o controle porque as plantas apresentam respostas variáveis aos tipos e/ou concentrações diferentes de herbicidas.

De acordo com o significado da variabilidade genética dentro das diversas populações enfatizadas por Allendorf e Luikart (2007), alta variabilidade genética dentro de populações de plantas daninhas pode indicar significativa quantidade de variação genética para escapar dos efeitos do agente de controle e também pode favorecer a seleção de genótipos resistentes.

A probabilidade de encontrar genótipos resistentes em populações com diversidade genética alta deve ser maior do que a chance de encontrar plantas resistentes em populações onde a variabilidade genética é baixa.

Desta forma, o conhecimento da diversidade genética parece ser um aspecto determinante para orientar o manejo diferencial e o desenvolvimento de métodos efetivos de controle das espécies de plantas daninhas. É possível que, para o controle de populações de plantas daninhas com alta variabilidade genética, por exemplo, seja necessário o desenvolvimento de técnicas diferenciadas de manejo, incluindo alternativas químicas e culturais.

A crescente dependência de glifosato para o controle de plantas daninhas, por exemplo, é uma grande preocupação para a manutenção da viabilidade de longo prazo desta valiosa ferramenta de manejo de plantas daninhas. A resistência de plantas daninhas a herbicidas não é um fenômeno recente. Plantas de *Convolvulus arvensis* resistentes a glifosato foram identificadas no estado de Indiana (EUA), na metade da década de 80, em áreas que haviam recebido aplicações repetidas de glifosato (Degennaro e Weller, 1984).

No entanto, a resistência de plantas daninhas ao glifosato passou de fato a se tornar uma grande preocupação alguns anos após a liberação das primeiras variedades de soja *Roundup Ready*®, em 1996, nos Estados Unidos. As espécies

que despertam maior preocupação são as do gênero *Conyza*. O primeiro relato de resistência de *Conyza* ao glifosato foi feito no estado de Delaware (EUA) em 2000 (VanGessel, 2001).



Figura 1 - Exemplos de *Conyza sumatrensis* observadas em seus diferentes estágios de desenvolvimento.

Atualmente, as plantas resistentes estão distribuídas por mais de 20 estados americanos e em mais de 40 países do mundo (Heap, 2009). No Brasil, os primeiros casos de resistência foram detectados no Rio Grande do Sul, em 2005, e desde então estes biótipos rapidamente tem se dispersado em todos os estados da região sul e, mais recentemente, no Centro-Oeste e Sudeste.

Em comum, todas as áreas nas quais se detectou o desenvolvimento de *Conyza* sp. resistente ao glifosato apresentam o uso frequente de glifosato para controle de plantas daninhas, pouco ou nenhum uso de herbicidas alternativos que propiciem controle adequado de *Conyza*. Além disso, todas as essas áreas sofrem práticas de plantio direto de longa duração (Loux et al., 2009).

2.3. Eletroforese de isozimas

O termo eletroforese foi criado em 1909 por Michaelis, quando descreveu a migração de colóide sob a influência de um campo elétrico, e vem sendo muito usada provocando entusiasmo nas áreas de genética de populações e evolutiva, sistemática e melhoramento vegetal.

A eletroforese pode ser definida como a migração de modo diferencial e próprio de partículas eletricamente carregadas, quando submetida a um determinado potencial elétrico em um pH estipulado (Lopes, 1984). Esta técnica possibilita o estudo da variação genética em nível de enzimas, as quais representam a expressão primária do gene.

Das muitas técnicas existentes para a análise de proteínas (enzimáticas ou não), a eletroforese em gel é sem dúvida a mais versátil e facilmente aplicável.

Na prática, quantidades mínimas de extratos crus de tecidos (sangue, insetos, folhas, caules, cotilédones ou endospermas de plantas esmagadas, etc.) homogeneizados de vários indivíduos, são colocadas em uma fenda de um suporte normalmente feito de amido de batata, poliacrilamida, ágar, agarose, acetato de celulose, ou qualquer outra substância capaz de formar uma matriz homogênea.

Quando se faz passar uma corrente elétrica através do gel, as proteínas do tecido migram a uma velocidade determinada em função da carga elétrica dos aminoácidos que a constituem, embora o tamanho e a configuração da proteína possam também influir na velocidade de migração. A eletroforese é tão sensível que se podem detectar proteínas que só diferem em um aminoácido de um total de várias centenas que as constituem (Ayala, 1978).

As proteínas sintetizadas por diferentes indivíduos de uma população são comparadas, fazendo-as correr em posição vizinha no gel durante um determinado tempo.

Uma vez que as proteínas tenham migrado, determina-se a posição das mesmas aplicando um corante específico para a proteína que está em estudo. Como produto da reação corante-enzima forma-se um complexo colorido e insolúvel no gel.

Dessa forma, pode-se visualizar, no gel, uma banda colorida, correspondente à posição de migração de enzima originalmente presente na amostra. No caso de amostra analisada conter enzimas com diferentes cargas ou de

diferentes tamanhos ou configurações espaciais, diversas frações são separadas dando origem a diversas bandas coloridas no gel (Medina Filho, 1983).

Como cada cadeia de aminoácidos de uma proteína (algumas proteínas são formadas por mais de uma cadeia) é o produto de um só gene, este estudo permite ao pesquisador estimar o número de loco de uma população que apresenta alelos múltiplos e quantos estão em homozigose.

A eletroforese, portanto, constitui-se em uma técnica que permite a detecção de mutações que alteram a estrutura das enzimas, que passa a ter múltiplas formas moleculares, modificando sua mobilidade eletroforética, porém, mantendo suas atividades catalíticas.

O termo “isozima” foi proposto por Market e Moller (1959) para descrever diferentes formas moleculares de proteínas, que apresentam especificidade enzimática similar ou idêntica.

Os procedimentos laboratoriais utilizados nesta técnica sofrem variações conforme a espécie pesquisada, o tipo de tecido que está sendo coletado (semente, raiz, folhas, bulbos, tecido cortical ou vegetativo, etc.), o tipo de proteína observada. Esta técnica tem sido adotada em muitos países para identificação de cultivares e registro de patentes, principalmente em trigo, milho, cevada e aveia e também utilizada em estudos genéticos de espécies florestais há aproximadamente 10 anos (Adams, 1983).

Os estudos de natureza evolutiva também tem tido muita importância nos campos de genética de populações e sistemática, na medida em que detectam maior parte da variabilidade genética existente no indivíduo, em comparação às técnicas mendelianas clássicas.

2.4. Variabilidade genética em plantas daninhas

Hamrick e Godt (1990) revisaram a literatura descrita para aloenzimas em 473 espécies de angiospermas e gimnospermas, analisando variações dentro e entre populações destes grupos de plantas. Em média, 50% dos locos de uma espécie de planta são polimórficas e a diversidade genética é 15% ($H_e = 0,149$). Dentro de uma população média, 34% dos locos são polimórficos e a diversidade média é 11% ($H_e = 0,113$). A variação genética em locos polimórficos é particionada

de modo que a maioria (78%) da diversidade é encontrada dentro das populações, enquanto uma pequena fração (22%) representa a diferenciação entre populações.

Estes autores mostraram em primeiro lugar que a diversidade genética em nível populacional reflete, com bastante precisão, a diversidade em nível de espécie. Em segundo lugar, as espécies com limitadas áreas geográficas tendem a ter menos diversidade genética. Em terceiro lugar, a maioria das diferenças nos níveis de diversidade isoenzimática é mais devida à proporção de locos polimórficos do que a diferenças na diversidade em locos polimórficos individuais.

Thébaud e Abbott (1995) analisaram sete sistemas enzimáticos (AAT, α EST, GDH, G3PD, G6PD, IDH e MDH) em cinco espécies de *Conyza*, *C. blakei*, *C. floribunda*, *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis* provenientes de várias localidades da França e foram capazes de detectar 17 locos enzimáticos. Eles verificaram que houve variação entre as espécies, mas não dentro de cada espécie, sendo todas as cinco espécies fixas para alelos alternativos.

Souza e Contel (2001), analisando genótipos de *Helianthus annuus* L. (Asteraceae) de 31 acessos e de cinco cultivares nos sistemas isoenzimáticos fosfoglicomutase (PGM), 6-fosfogliconato desidrogenase (PGD), fosfoglicoisomerase (PGI) e esterase (EST), detectaram um total de seis locos e 14 alelos para estes quatro sistemas, evidenciando baixo grau de diversidade genética, variando entre 0,003 e 0,418. Isso indica uma grande semelhança entre estes materiais nos sistemas enzimáticos analisados.

A análise da diversidade genética em 40 populações de *Euphorbia heterophylla* em propriedades localizadas nas regiões oeste e sudoeste do estado do Paraná, resistentes aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintetase (ALS), apresentou um coeficiente médio de similaridade de 43%, um valor muito baixo quando comparado ao de espécies cultivadas (Winkler e Vidal, 2003).

Resultado semelhante foi obtido por (Rutledge et al., 2000), que observaram para *Echinochloa crus-galli* uma distância genética de 43% entre 16 populações selecionadas.

Acessos de *Eichornia crassipes* (aguapé) apresentaram similaridade genética de 90%. Para dados de RAPD, esse percentual é considerado alto, o que se explica pela forma de propagação vegetativa, que diminui a possibilidade de recombinação genética (Cardoso et al., 2002).

A variabilidade genética entre seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala*) foi avaliada por meio de métodos multivariados, utilizando-se caracteres isoenzimáticos e descritores botânico-agronômicos (Castro et al., 2002). A estabilidade da divergência genética entre os acessos de carqueja foi estimada em cinco épocas de colheita e a caracterização isoenzimática foi realizada nove meses após transplante das mudas. Em relação à análise isoenzimática, apenas o sistema esterase, entre os testados, apresentou resolução, tendo sido formados dois grupos.

Constatou-se, portanto, que a utilização dos descritores botânico-agronômicos aos 145 dias após transplante foi mais eficiente na discriminação dos acessos, com a formação de quatro grupos de acessos.

O potencial das isozimas como marcadores genéticos em *Baccharis myriocephala* foi verificado, permitindo a utilização destas para caracterização de variedades em complementação a características morfológicas.

O estudo da variabilidade genética em plantas daninhas tem mostrado que no complexo *Bidens pilosa* L. (picão-preto), por exemplo, empregando 10 sistemas enzimáticos, foram revelados 16 locos e destes somente três foram polimórficos. A diversidade genética, para este complexo, avaliada por Grombone-Guaratini et al. (2005) foi baixa e o valor encontrado foi de 3,2% de locos polimórficos.

Ruschel et al. (2008) analisaram 12 sistemas enzimáticos (AAT, DIA, EST, FEST, PGM, GPI, IDH, MDH, ME, PER, 6PGDH e SKDH) em quatro populações de *Solanum mauritianum* (fumo brabo) do Estado de Santa Catarina e detectaram 18 locos, 14 dos quais foram polimórficos com 2,7 alelos por loco, em média. A heterozigosidade observada média para as quatro populações foi 0,265 enquanto a esperada foi 0,302, demonstrando que esta espécie apresenta uma alta variabilidade genética. O valor médio de $F_{ST} = 0,112$ mostrou que a variabilidade genética dentro das populações é bem maior que entre elas que apresentaram um baixo grau de diferenciação genética.

Frigo et al. (2009), analisando 3 populações de *E. heterophylla*, encontraram um nível moderado de diferenciação genética ($F_{ST}=0,1410$), sugerindo entre eles alta pressão de seleção imposta pelo uso de herbicidas detectadas em dados de α e β de esterases. A similaridade as plantas de *E. heterophylla* expostas a herbicidas orgânicos e sensíveis foi alta ($I = 0,9670$); entretanto, a média observada e heterozigosidade esperada foi maior em plantas de culturas orgânicas ($H_o =$

0,3529; $H_e = 0,3923$) que em plantas de culturas não orgânicas ($H_o = 0,2597$; $H_e = 0,3693$); e os menores valores de heteroziguidade foram encontrados para a população resistente a herbicidas ($H_o = 0,2070$; $H_e = 0,3360$).

Ren et al. (2010) analisaram 17 populações de *C. sumatrensis* da China utilizando marcadores de ISSR e detectaram alta variabilidade genética evidenciada pelo valor de $H_e = 0,385$.

Mangolin et al. (2012) analisaram duas populações de *Conyza sumatrensis* e *C. canadensis* para os sistemas enzimáticos MDH, ACP e α -/ β -esterases e observaram que a diversidade genética encontrada pode ser considerada alta, uma vez que o polimorfismo foi detectado em 7 dos 14 locos analisados (50%). Contudo, um baixo nível de diferenciação genética foi encontrado para duas populações de *Conyza*, onde a Heteroziguidade observada (H_o) para α -e β de esterases de *C. sumatrensis* e *C. bonariensis* foi 0,4310 e 0,4293, respectivamente. Estes valores são inferiores aos valores de heteroziguidade média esperada (H_e), que se verificou ser 0,5125 e 0,4978. O déficit de heterozigotos foi maior quando as plantas de buva foram avaliadas quanto aos locos *mbMdh* e *Acp-2*. Heteroziguidade observada (H_o) para *C. sumatrensis* foi 0,4410 comparados a um valor esperado (H_e) de 0,6699. Para *C. bonariensis*, a heteroziguidade média observada foi de 0,4333 em relação ao valor esperado de 0,6149

Os fatores que favorecem a seleção de biótipos resistentes envolvem características relacionadas às próprias plantas daninhas, aos herbicidas e às práticas culturais. A grande diversidade genética característica de algumas populações de plantas daninhas favorece a seleção de indivíduos resistentes aos herbicidas em virtude da maior probabilidade de se encontrar alelos na população que conferem resistência ao herbicida utilizado.

De forma análoga, grandes infestações destas plantas também favorecem o aumento dos riscos de seleção para resistência (Vidal e Merotto Jr., 2001; Winkler et al, 2003). De maneira geral, 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 reduzida 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 evolutivos e

biológicos, incluindo eventos relacionados ao “efeito gargalo”, associado ao fundador, pequeno tamanho da população, endocruzamento, forte seleção direcional e falta de mecanismos de dispersão para grandes distâncias (Warwick, 1990).

Contudo, todas as formas de vida do planeta são caracterizadas por variações genéticas que podem ser estudadas para fins de inventário biológico e conservação.

As variações genéticas intraespecíficas são investigadas quando buscamos compreender as relações entre indivíduos e populações de cada espécie. Portanto, quando o interesse é saber qual o parentesco entre indivíduos, se existe ou não fluxo gênico entre populações ou qual o status de conservação de uma espécie em particular, estuda-se a variação genética intraespecífica, fundamental para a persistência das espécies na natureza. Assim, o diagnóstico de quanto existe de variação genética e de como ela é distribuída geograficamente em cada espécie é necessário para caracterização de seu status de conservação.

Por outro lado, a diversidade genética entre espécies é avaliada quando queremos compreender as relações filogenéticas nos vários níveis taxonômicos (espécies, gêneros, famílias, ordens etc.), ou caracterizar espécies por meio da identificação de marcadores conservados que permitam sua diferenciação (Santos et al., 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O primeiro passo no estudo com isozimas é a escolha da natureza do gel a ser utilizado na eletroforese, que pode ser natural ou sintético. Os naturais compreendem aqueles que possuem natureza química bem variada como, por exemplo, proteínas como gelatina e caseína e polissacarídeos, como amido, ágar e pectina; entre os sintéticos podemos citar a poliacrilamida (Alfenas, 2006).

A eletroforese em gel de amido foi inicialmente introduzida por Smithies (1955) estudando soro de proteínas humanas. Sua resolução somente foi superada pelo gel de poliacrilamida.

O gel de amido, por apresentar um caráter menos oneroso do que os de poliacrilamida, é um método muito utilizado, adaptado ao método de hidrólise descrito por Smithies (1955). Antes, utilizava-se amido hidrolisado de batata; agora, utilizando-se amido de milho 13% por grande maioria dos pesquisadores no Brasil, tem-se conseguido resultados compatíveis aos de amido de batata hidrolisado disponível no mercado (Val, 1981; Mori et al., 1993).

De doze sistemas enzimáticos analisados para avaliar a existência de diversidade genética em *Conyza*, apenas quatro sistemas enzimáticos foram revelados, MDH (Malato desidrogenase), ACP (Fosfatase ácida), GPI (Glucose-6-fosfato isomerase), PGM (Fosfoglucomutase), de áreas rurais de três cidades da região noroeste do estado do Paraná: Guarapuava, Astorga e Nova Esperança, em um total de 56 plantas por local (Figura 2). Foram testadas quatro soluções de extração, das quais apenas uma mostrou-se mais eficiente (Quadro 1).

Quadro 1 - Solução de extração utilizada para extrair as isoenzimas de brotos de folhas de *Conyza* sp.

Solução de Extração	
Tampão fosfato 1,0 M pH 7,0	890 µL
PVP-40 5 %	50 mg
EDTA 1,0 mM	10 µL
B-mecaptoetanol	5 µL

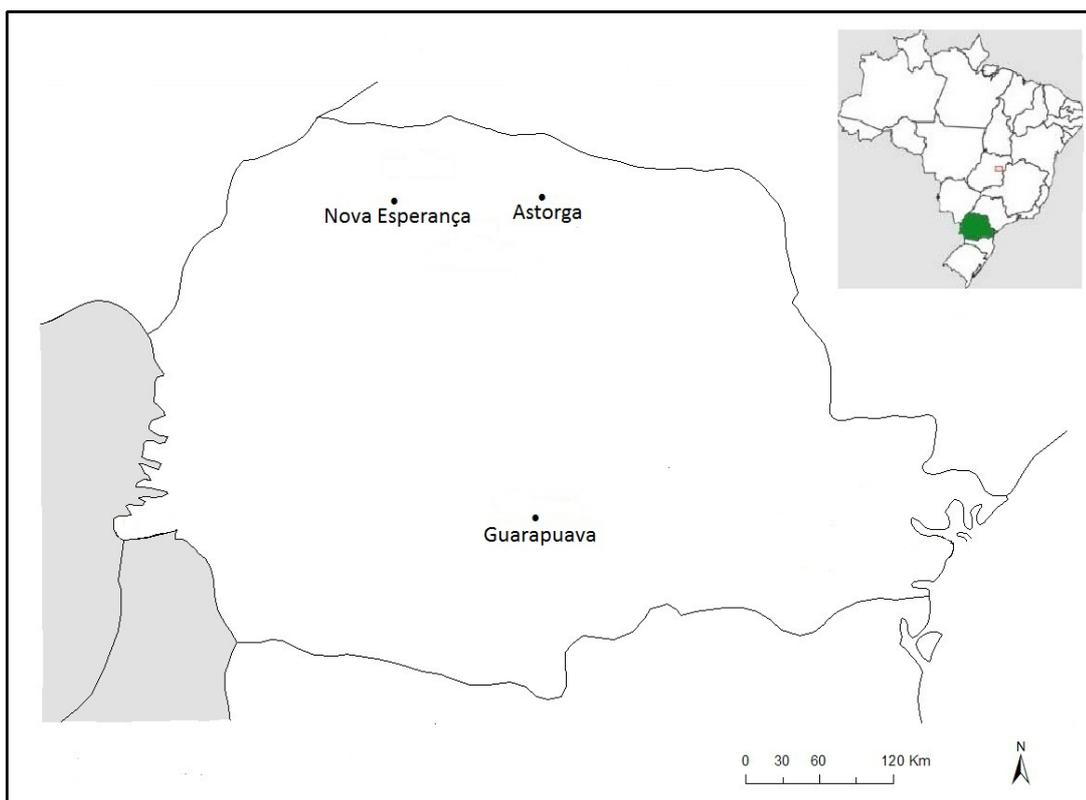


Figura 2 - Mapa de Localização dos municípios do estado do Paraná, onde foram coletados os acessos de *Conyza* sp.

As sementes coletadas foram colocadas para germinar em casa de vegetação (05/2010). Foram realizadas irrigações diárias até as plantas atingirem o florescimento pleno (01/2011), quando foi realizado o corte das mesmas para a confecção das unicatas.

Atualmente, as amostras coletadas para identificação encontram-se disponíveis no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM, 2011), identificadas com os números: HUEM 21290; HUEM 21291; HUEM 21292; HUEM 21293 e HUEM 21294.

Após o brotamento da quarta folha, as plantas foram utilizadas na extração das isozimas. Pequenos brotos e folhas jovens foram coletados com o auxílio de uma pinça e colocados em tubos Eppendorf de 1,5mL, juntamente com 20 ml de solução extração e mantidos no gelo para a maceração.

As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada Hettich Mikro 200 R, durante 30 minutos com 12.000 r.p.m., a 4°C. Os sobrenadantes foram

adsorvidos em papel de filtro (4x5mm) e aplicados em gel de amido 16% (Penetrose 50®).

Para o preparo do gel, a suspensão de amido foi fervida em frasco Erlenmeyer, em bico de Bunsen, com agitação contínua, até ficar hialina. A solução foi derramada em uma placa de vidro com dimensões 18x18x0,6, permanecendo na geladeira por um período de 17 horas. Em seguida, a solução foi submetida à eletroforese horizontal em uma corrente contínua de 200V, com 50V nas extremidades do gel, que corresponde aproximadamente 20 mA, verificada por meio de um voltímetro, e contendo tampão de corrida Tris (0,0103M) e ácido cítrico (0,0028M) pH:7,4 na cuba. O mesmo tampão foi diluído 15 vezes, permitindo a obtenção e visualização das enzimas para análise fenotípica.



Figura 3 - Plântulas de *Conyza* sp. germinadas em pequenos vasos com areia e substrato comercial à base de turfa mantidos em casas de vegetação.

3.1. Análise dos dados

Posteriormente à revelação dos quatro sistemas isoenzimáticos analisados em gel de amido descritos no Quadro 2, com as nomenclaturas das enzimas utilizadas propostas por Murphy et al. (1996), os padrões de bandas foram

analisados geneticamente. A interpretação genética foi baseada na estrutura quaternária das enzimas segundo Ward et al. (1992). A análise feita permitiu estimar as frequências dos alelos e os parâmetros de diversidade genética, estimando a proporção de locos polimórficos; o número médio de alelos por loco e heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e); o afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg; o coeficiente de endogamia (F_{IS}); o déficit de heterozigotos (F_{IT}); a proporção da diversidade genética entre as populações (F_{ST}); e o fluxo gênico entre populações (Nm) para os 3 acessos estudados, empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999).

Quadro 2 – Nome, número de comissão de enzima (nº E. C.) e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido

Enzima (Abreviação)	nº. E. C.	E.Q.
Glicose 6 - fosfato isomerase (GPI)	5.3.1.9	Dimérica
Fosfatase ácida (ACP)	3.1.3.2	Monomérica
Malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37	Dimérica
Fosfoglucomutase (PGM)	5.4.2.2	Monomérica

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 56 plantas de *Conyza* sp., provenientes do município de Astorga, 56 plantas provenientes de Nova Esperança e 56 plantas provenientes de Guarapuava.

A expressão enzimática dos alelos detectados neste estudo está ilustrada nos zimogramas representados pela Figura 4. Visualiza-se que a enzima MDH foi a que apresentou maior número de locos (cinco), na qual detectou-se a presença de três grupos diferentes de isozimas: o MDH microcorpos (mbMDH), MDH mitocondrial (mtMDH), e MDH citosol ou solúvel (sMDH). Uma mbMDH isozima foi evidente (mbMDH-5); dois outros locos foram evidentes para mtMDH isozimas (mtMdh-3 e mtMdh-4) e dois outros locos foram evidentes para isozimas mitocondriais (mtMdh-3 e mtMdh-4) e mais dois locos para isozimas solúveis (sMDH-1 e sMDH-2). Também foi observada a presença de heterodímeros(hd*). Isso ocorre devido à organização estrutural complexa destas enzimas, que inclui a capacidade de produzir heterodímeros entre os produtos de alelos do mtMdh e loco sMDH.

A enzima PGM foi a que apresentou menor número de loco (um), enquanto as enzimas GPI e ACP apresentaram número idêntico de locos (dois), todos monomórficos para todas as populações analisadas.

Das análises eletroforéticas obtidas, foi possível identificar 10 locos e 10 alelos, dentre os quatro sistemas isoenzimáticos estudados nas três populações de *Conyza* sp. Nestes 10 alelos detectados para estes sistemas enzimáticos não foi observado diversidade genética dentro e entre as populações analisadas. O mesmo resultado foi encontrado por Thébaud e Abbott (1995) dentro de cada espécie analisada.

Tal resultado pode ser explicado por algumas hipóteses variadas, como o fato de esta espécie de planta ser autocompatível, sugerindo a ocorrência de autogamia. Desta forma, o pólen é liberado antes que os capítulos se abram e a maioria de suas sementes, quando dispersas, 80% delas, geminam próximo à planta mãe e aparentemente não são polinizadas por insetos, (Thébaud et al., 1996; Smisek., 1995), sugerindo, assim, que estas populações analisadas sejam geneticamente próximas, evidenciando um ancestral em comum.

O predomínio de fenótipos homocigotos observado nas amostras de *Coryza* analisadas é esperado em razão da autocompatibilidade, sendo constatado tal fato por Smisek (1995) que detectou nível de cruzamento próximo a 4% e variando de 1,2 a 14,5%.

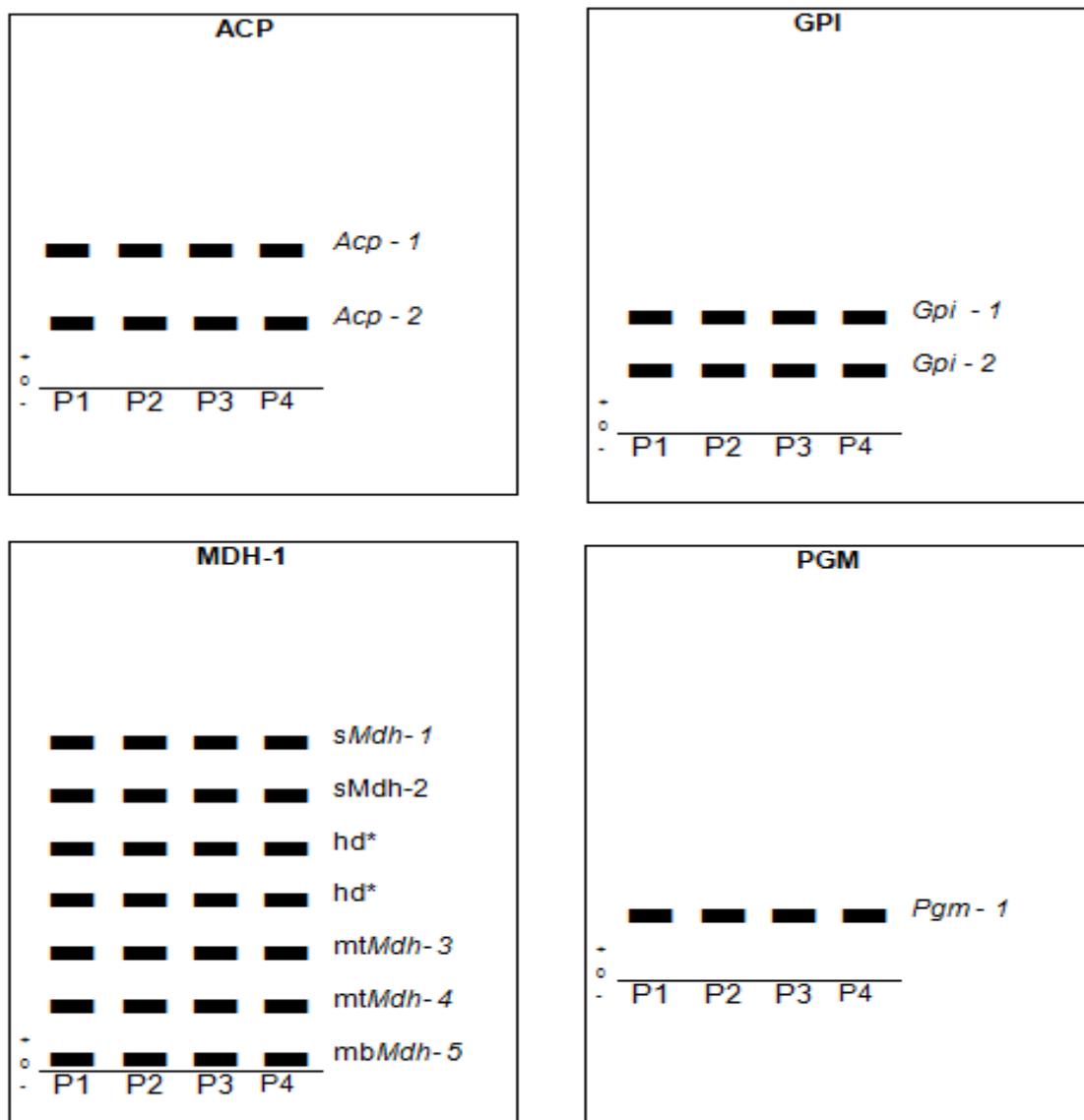


Figura 4 – Zimograma representado o padrão de bandas dos 4 sistemas isoenzimáticos analisados em gel de amido, com os seus respectivos locos presentes nas populações (P1: população do município de Astorga; P2: população do município de Guarapuava; P3: população do município de Nova Esperança. Todas do estado do Paraná).

Resultado semelhante foi encontrado por Souza e Contel (2001), analisando genótipos de *Helianthus annuus* L. (Asteraceae) de 31 acessos e de cinco cultivares nos sistemas isoenzimáticos fosfoglicomutase (PGM), 6-fosfogliconato

desidrogenase (PGD), fosfoglicoisomerase (PGI) e esterase (EST). Foram detectados um total de seis locos e 14 alelos para estes quatro sistemas, evidenciando baixo grau de diversidade genética, variando entre 0,003 e 0,418. Isso indica uma grande semelhança entre estes materiais nos sistemas enzimáticos analisados.

No complexo *Bidens pilosa* L. (picão-preto), empregando 10 sistemas enzimáticos, foram revelados 16 locos e destes somente três foram polimórficos. A diversidade genética, para este complexo, avaliada por Grombone-Guaratini et al. (2005), foi baixa e o valor encontrado foi de 3,2% de locos polimórficos.

Acessos de *Eichornia crassipes* (aguapé) apresentaram similaridade genética de 90%, considerada alta, o que se explica pela forma de propagação vegetativa, que diminui a possibilidade de recombinação genética (Cardoso et al., 2002).

Mori et al. (1999), trabalhando com *Egeria najas* na bacia hidrográfica do rio Paraná, analisaram os padrões isoenzimáticos das enzimas MDH, IDH, SKDH, ACP e AAT. Foram encontrados somente dois padrões distintos de bandas, que diferenciam os materiais genéticos e separaram os indivíduos em quatro classes distintas. Os padrões de isozimas pouco discriminaram diferenças entre eles, podendo concluir, por meio destes resultados, que pouca variabilidade genética estaria ocorrendo nas populações estudadas. Entretanto, para comprovar estes resultados, utilizaram-se também os procedimentos de eletroforese de DNA (técnica de RAPD). Em certos casos, as isozimas são ferramentas limitadas para discriminar diferenças entre indivíduos.

Na análise de grupamento, observou-se que a *Egeria najas* possui variabilidade genética, evidenciando que as populações são formadas por diversos genótipos com pequenas diferenças genéticas entre plantas. Os indivíduos foram separados por distâncias genéticas inferiores a 0,24, ou seja, possuem similaridades genéticas superiores a 0,78.

Por fim, estudos empregando isozimas (Barret., 1992) têm evidenciado que muitas populações de plantas daninhas contêm reduzida diversidade genética e que a estimativa da diversidade é idêntica tanto quando avaliada por meio de isozimas como quando avaliada com marcadores de DNA, como, por exemplo, RAPD e AFLP (Okuno et al., 1998; Pester et al., 2003). Contudo, no caso do gênero *Conyza*, é necessária uma análise mais aprofundada para constatar se existe variabilidade

genética, uma vez que Ren et al. (2010) detectaram alta variabilidade genética evidenciada pelo valor de $H_e = 0,385$ em 17 populações de *Conyza sumatrensis* da China, utilizando marcadores de ISSR.

Estes resultados obtidos para *C. sumatrensis* nos parecem paradoxais. Pelo fato de organismos poliplóides terem várias cópias do mesmo gene, eles têm mais probabilidade que os diplóides de sofrerem mutações e de acumularem estas mutações ao longo do tempo, e, portanto, deveria se esperar que espécies de *Conyza* exibissem maior variabilidade genética.

Além disso, o fato de *Conyza* estar distribuída por vários continentes mostra que é uma espécie com alta adaptabilidade, característica esta que depende diretamente da diversidade genética da espécie. Deste modo, *C. sumatrensis* deveria apresentar maior variabilidade do que a observada no presente experimento e no de Thébaud e Abbott (1995).

É importante frisar que a frequente exposição a herbicidas pode levar à diminuição da heterozigosidade e que o processo de seleção de biótipos resistentes reduz ainda mais a heterozigosidade, implicando em baixos níveis de diversidade genética.

5. CONCLUSÕES

A partir das análises bioquímicas das três populações de *Conyza* sp. envolvidas neste trabalho, foram destacadas as seguintes conclusões:

- a) As três populações analisadas de *Conyza* sp. apresentaram uniformidade genética, comprovada pela presença de apenas indivíduos homozigotos.
- b) As enzimas utilizadas no presente estudo não foram suficientes para revelar variação genética em *Conyza* sp.
- c) A resistência exibida por *Conyza* sp. ao glifosato e ao clorimuron-etil deve ser devida à sua heterogeneidade genética não revelada no presente estudo.
- d) Estudos adicionais com demais marcadores, como, por exemplo, marcadores de DNA, podem constatar uma diversidade genética nas populações analisadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.T. Application of isozymes in tree breeding. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 381-400.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins-fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 574p.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Massachusetts: Blackwell Publishing Maden, 2007. 642p.
- AYALA, F.J. The mechanisms of evolution. **Scientific American**, 1:14-27, 1978.
- BARRET, S.C.H. Genetics of weed invasions. In: JAIN, S.K.; BOTSFORD, L.W. (eds.). **Applied Population Biology**. Netherlands Kluwer Academic Publishers: 1992. p. 91-119.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1991. 377p.
- BHOWMIK, P.C.; BEKECH, M.M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy**, 1:67-71, 1993.
- BREMER, K.; GUSTAFSSON, M.H.G. East gondwana of the sunflower alliance of families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94:9188-9190, 1997.
- BRUCE, J.A.; KELLS, J.J. Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. **Weed Technology**, 4:642-647, 1990.
- CARDOSO, L.R.; MARTINS, D.; KURAMAE, E.E.; TANAKA, R.H.; MORI, E.S. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no estado de São Paulo. **Planta Daninha**, 20:1-5, 2002. (Edição Especial).

CASTRO, H.G.; SILVA D.J.H.; FERREIRA, F.A.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Estabilidade da divergência genética em seis acessos de carqueja. **Planta Daninha**, 20:33-37, 2002.

CRAWFORD, D.J. Enzyme electrophoresis and plant systematics. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS P.S. (eds.). **Isozymes in Plant Biology**. Portland: Discorides Press, 1989. p. 146-164.

DEANS, S.G.; SVOBODA, K.P.; GUNDIDZA M.; BRECHANY, E.Y. Essential oil profiles of several temperate and tropical aromatic plants: their antimicrobial and antioxidant activities. **Acta Horticulturae**, 306:229-232, 1992.

DEGENNARO, F.P.; WELLER, S.C. Differential susceptibility of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) biotypes to glyphosate [Indiana]. **Weed Science**, 32:472-476, 1984.

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

FRIGO, M.J.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA, R.S.J.; MACHADO, M.F.P.S. Esterase polymorphism for analysis of genetic diversity and structure of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) populations. **Weed Science**, 57:54-60, 2009.

GROMBONE-GUARATINI, M.T.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. Low allozymic variation in the *Bidens pilosa* L. complex (asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 43:335-345, 2005.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (eds.). **Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 1990. p. 43-63.

HEAP, I. **International survey of herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 20, junho, 2009.

HOLM, L.G. **World weeds: natural histories and distribution**. Toronto: Wiley, 1997. 1129p.

JAUZEIN, P. Three unrecognized weeds of the french flora. In: VIII E COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA BIOLOGIE, L'ÉCOLOGIE ET LA SYSTÉMATIQUE DES MAUVAISES HERBES. Paris, 1988. **Resumos...** Paris: A.N.P.P, 1988. p. 199-208.

KELLY, A.; BRUNS, V. Dissemination of weed seeds by irrigation water. **Weed Science**, 23:486-493, 1975.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Bernardo do Campo: Basf, 1999. 978p.

LAZAROTO, A.C.; FLECK, G.N.; VIDAL, A.R. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, 38:852-860, 2008.

LEROUX, G.D.; BENOIT, D.; BANVILLE, S. Effect of crop rotations on weed control, *Bidens cernua* and *Erigeron canadensis* populations, and carrot yields in organic soils. **Crop Protection**, 15:171-178, 1996.

LOPES, C.R. **Estudos sobre as relações filogenéticas entre algumas espécies de Coffea**. Botucatu: UNESP, 1984. 169p. (Tese de Livre Docência).

LOUX, M.; STACHLER, J.; JOHNSON, B.; NICE, G.; DAVIS, V.; NORDBY, D. **Biology and management of Horseweed. The glyphosate, weeds, and crop series**. West Lafayette: Purdue University (Purdue Extension publication number ID-32), 2009. 11p.

MANGOLIN, C.A.; JUNIOR, O.R.S.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic Diversity in Weeds. In FERNANDEZ, R.A. (eds). **Herbicides. Environmental Impact Studies and Management Approaches**, 2012. p. 223-248.

MACHADO, S.M.F.; MILITAO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A.; RIBEIRO, A.; MORAIS, S.M.; ALENCAR, J.W.; BRAZ FILHO, R. Essential oil of *Conyza sumatrensis* (Retz) Walk. **Journal of Essential Oil Research**, 7:83-84, 1995.

MARKET, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes:tissue, ontogenic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 45:753-763, 1959.

MEDINA FILHO, H.P. **Eletroforese em gel de amido: aplicações em genética e melhoramento de plantas**. Campinas: IAC, 1983. 15p.

MONDIN, C.A. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. In: MARIATH, J.E.A.; SANTOS, R.P. (org.). **Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética**. Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 1:209-211, 2006.

MORI, S.E.; GOUVEIA, F.C.; LEITE, M.S.; MARINO, L.C.; MARTINS, D.; VELINI, D.E. Caracterização genética de populações de *Egeria najas* presentes no reservatório de Jupuíá e rios afluentes. **Planta Daninha**, 1:17-17,1999.

MURPHY, R.W.; SITES JR., J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLER, C.H. Proteins: isozyme electrophoresis. In: HILLS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (eds.). **Molecular systematic**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 51-120.

NANDULA, V.K.; EUBANK, T.W.; POSTON, D.H.; KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, 54:898-902, 2006.

OKUNO, K.; EBANA, K.; VOOV, V.B.; YOSHIDA, H. Genetic diversity of central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. **Genetics. Resources and Crop Evolution**, 45:289-3004, 1998.

PESTER, T.A.; WARD, S.M.; FENWICK, A.L.; WESTRA, P.; NISSEN, S.J. Genetic diversity of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) determined with RAPD and AFLP markers. **Weed Science**, 51:287-293, 2003.

REGEHR, D.L.; BAZZAZ, F.A. The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a successional winter annual. **Journal of Ecology**, 67:923-933, 1979.

REN, X.M.; LI, Q.X.; DING, Q.J. Genetic variation and spread pattern of invasive *Conyza sumatrensis* around China's Three Gorges Dam. **Acta Oecologica**, 36:599-603, 2010.

ROLLIN, M.J.; TAN, D. **Fleabane: first report of glyphosate resistant flax leaf fleabane from western Darling**. Disponível em: www.weeds.rc.org.au/documents/fleabane_preceedings%20_mar_04.pdf. Acesso em: 26, jun, 2010.

RUTLEDGE, J.; TALBERT, R.E.; SNELLER, C.H. Análise RAPD de variação genética entre propanil-resistentes e suscetíveis de *Echinochloa crus-galli* populações em Arkansas. **Weed Science Society of America**, 48:669-674, 2000.

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

RUSCHEL, A.R.; PEDRO, J.; NODARI, R.O. Diversidade genética em populações antropizadas do fumo brabo (*Solanum mauritianum*) em Santa Catarina, Brasil. **Scientia Florestalis**, 36:63-72, 2008.

SANTOS, G.; OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; MACHADO, M.F.P.S.M. Buva com resistência múltipla a herbicidas é identificada como *Conyza sumatrensis* no Paraná. **Informativo Técnico UEM-PGA**, 1:1-3, 2012.

SANTOS, R.F.; LACERDA, R.D.; REDONDO, A.R.; NASCIMENTO, A.M.A.; SOUZA, C.E.; BORBA, L.E.; RIBEIRO, A.R.; LOVATO, B.M. **Diversidade Genética**. Disponível em: www.icb.ufmg.br/lbem/pdf/santos09biotaminas-divgen.pdf. Acesso em: 28, março, 2012.

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

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the sérum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 61:620-641, 1955.

SOUZA, S.F.; CONTEL, B.P.B. Análise da variabilidade de isoenzimas em acessos e cultivares de girassol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:771-779, 2001.

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.

THÉBAUD, C.; ABBOTT, R.J. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. **American Journal of Botany**, 82:360-368, 1995.

THÉBAUD, C.; FINZI, A.C.; AFFRE, L.; DEBUSSCHE, M.; ESCARRE, J. Assessing why two introduced *Conyza* differ in their ability to invade Mediterranean old fields. **Ecology**, 77:791-804, 1996.

VAL, A.L.; SCHWANTES, A.R.; SCHWANTES, M.L.B.; LUCA, P.H. Amido hidrolisado em milho como suporte eletroforético. **Ciência e Cultura**, 33:992-996, 1981

VANGESSEL, M.J. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, 49:703-705, 2001.

VENABLE, D.L.; LEVIN, D.A. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. **Plant Systematic Evolution**, 143:1-16, 1983.

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

WARD, R.D.; SKIBINSKI, D.O.F.; WOODWARK, M. Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. **Evolutionary Biology**, 26:73-159, 1992.

WARWICK, S.I. Genetic variations in weeds – with particular reference to Canadian agricultural weeds. In: KAWANC, S. **Biological approach and evolutionary trends in plants**. London: Academic, 1990. p. 3-18.

WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (eds.). **Isozymes in plant biology**. Portland, Oregon: Discorides Press, 1989. p.5-45.

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.

YEH, F.C.; YANG, R-C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z-H.; MAO, J.X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/faq.htm>. Acesso em: 20, julho, 2011.