

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ALAIM ANDERSON FERNANDES SOARES

Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*

**Maringá
2010**

ALAIM ANDERSON FENANDES SOARES

Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Claudete Aparecida Mangolin

Maringá
2010

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

S676p Soares, Alaim Anderson Fernandes
Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*
/ Alaim Anderson Fernandes Soares -- Maringá, 2010.
60 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2010.

1. *Conyza bonariensis*. 2. *Conyza canadensis*. 3. Buva. 4. Isozimas. 5. Diversidade genética. I. Mangolin, Claudete Aparecida, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 21.ed. 572.838

AHS-002857

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALAIM ANDERSON FERNANDES SOARES

Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Claudete Aparecida Mangolin
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Elemar Voll
EMBRAPA – Soja - Londrina

Profa. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 31 de agosto de 2010.

Local de defesa: Auditório do Nupélia, Bloco H90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTO(S)

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo como a minha esposa pela paciência e sabedoria de uma boa mulher/parceira da vida conjugal; a minha orientadora Dra. Claudete Mangolin, que, sem sombra de dúvidas, foi a pessoa que mais me adicionou o “combustível” de ânimo e persistência, sendo muitas vezes, maternal; a todos do laboratório, em especial ao Denis e Ângela, pelos momentos descontraídos, porém preocupantes como bons estudantes.

Em particular, a planta *Conyza*, por ter gerado tamanha dificuldade, porém valorizante para meu crescimento profissional e pessoal.

Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*

RESUMO

No presente estudo foi utilizado o sistema PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e eletroforese em gel de amido para identificar e analisar polimorfismos para os *loci* de α - e β -esterases, malato desidrogenase e fosfatase ácida de plantas de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*, com a finalidade de caracterizar a diversidade genética destas espécies. *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* são popularmente conhecidas no Brasil como “buva”; elas são plantas daninhas comuns e anuais, essas duas espécies infestam áreas abandonadas, culturas perenes e lavouras anuais como a soja, o milho, o algodão e o trigo. O estudo e conhecimento da diversidade genética e da estrutura genética de populações são elementos importantes para identificar as formas de manejo, e para orientar o desenvolvimento de planos efetivos de controle das plantas daninhas. Foram avaliados 7 *loci* de esterases, 5 para malato desidrogenase e 2 para fosfatase ácida. As frequências alélicas foram estimadas para os *loci* *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *mbMDH* e *ACP-2* e o polimorfismo avaliado foi de 50%. O valor positivo de F_{IS} indicou um déficit de heterozigotos ou um excesso de plantas homozigotas. Um baixo nível de diferenciação genética foi encontrado entre as plantas de *Conyza bonariensis* e de *Conyza canadensis*, sugerindo uma alta troca de genes entre as duas populações. O F_{ST} calculado para estas populações foi de 0,0144 quando esterases foram avaliadas e de 0,0239 quando malato desidrogenase e fosfatase ácida foram avaliadas. Também foi evidente que existe uma deficiência de heterozigotos nas duas populações de *Conyza*, esta informação é dada pelo valor positivo de F_{IS} ($F_{IS} = 0,1484$ para as esterases e de 0,32 para MDH e ACP). Os valores positivos de F_{IS} indicam um déficit de heterozigotos, ou um excesso de plantas homozigotas. No presente estudo, podemos informar que os programas de manejo desenvolvidos para uma das espécies de *Conyza* poderá ser eficaz para a outra, uma vez que um baixo nível de diferenciação genética foi detectado entre elas e que o conhecimento da diversidade genética é necessário para que o manejo diferencial ou específico possa ser efetivo no controle para a espécie.

Palavras-chave: *Conyza bonariensis*; *Conyza canadensis*; buva; isozimas; diversidade genética.

Polymorphism of isozymes in populations of *Conyza*

ABSTRACT

In this study PAGE system (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and starch gel electrophoresis had been used to identify and to analyze polymorphisms for *loci* of α - and β -esterases, malato dehydrogenase and acid fosfatase of *Conyza canadensis* and *Conyza bonariensis* plants, with the purpose to characterize the genetic diversity of these species. *Conyza canadensis* and *Conyza bonariensis* are known popularly in Brazil as “buva”. They are common annual weed and these two species infest abandoned areas, perennial cultures and annual farmings as soybean, maize, cotton and wheat. The study and knowledge of the genetic diversity and the structure of population genetics are important elements to identify the handling forms, and to guide of effective control planning of the above mentioned weed. Seven *loci* of esterases, 5 for malato dehydrogenase and 2 for acid fosfatase had been evaluated. Allele frequencies were estimated for the *loci* *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *mbMDH* and *ACP-2* and whereas polymorphism was estimated in 50%. F_{IS} positive rate showed a deficit of heterozygotes or an excess of homozygous plants. A low level of genetic differentiation was found between the plants of *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis*, high genetic exchange among the two populations has been suggested. The F_{ST} calculated for these populations was 0.0144 when esterases had been evaluated and 0.0239 when malato dehydrogenase and acid fosfatase had been evaluated. Also it was evident that a deficiency of heterozygotes in the two *Conyza* populations exists. F_{IS} positive rate showed a deficit of heterozygotes or an excess of homozygous plants. This information was given by the positive value of F_{IS} ($F_{IS} = 0.1484$ for esterases and 0.32 for MDH and the ACP). In the present study we can inform that the control planning developed for one of the *Conyza* species can be efficient for the other, since a low level of genetic differentiation was detected between them and that the knowledge of genetic diversity is necessary such that the either differential control planning or specific control planning can be effective in the control for the species.

Keywords: *Conyza bonariensis*; *Conyza canadensis*; buva; isozymes; genetic diversity.

SUMÁRIO

Capítulo 1

1	Introdução	07
2	Objetivos	09
3	Revisão bibliográfica	10
	3.1 Biologia e ecofisiologia de <i>Conyza</i>	10
	3.2 Distribuição e manejo de <i>Conyza</i>	12
	3.3 Resistência a herbicidas	13
	3.4 Diversidade genética e o uso de Marcadores Moleculares	15
4	Referências	19

Capítulo 2

31

	Polimorfismo de isozimas em populações de <i>Conyza</i>	31
	NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO WEED RESEARCH	53

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A existência de variabilidade genética em indivíduos de uma população aumenta a chance de alguns para responder diferentemente frente a alterações do meio ambiente, de modo que isto possa garantir a preservação da espécie (ALLENDORF, 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 que as plantas têm, provavelmente, uma 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. Uma forma de avaliar esta variabilidade é analisando isozimas (que são diferentes formas de uma mesma enzima). O estudo de polimorfismo para isoesterases em plantas tem sido realizado desde a década de 60. Assim, em estudos que buscam detectar *loci* polimórficos, objetivando estimar a diversidade genética em espécies vegetais usando marcadores bioquímicos, o sistema esterase tem sido usual e prioritariamente adotado como marcador genético-bioquímico (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998); em vários trabalhos (MANGOLIN, PRIOLI, MACHADO, 1997; RESENDE et al., 2004; SOUZA, MACHADO, RESENDE, 2000; PEREIRA et al., 2002; ORASMO et al., 2003; CARVALHO et al., 2003) foram demonstrados que as isozimas esterases são produzidas por vários e diferentes *loci* que apresentam na sua maioria, herança co-dominante, tratando-se,

portanto, de um sistema enzimático adequado para estimar a diversidade genética e para analisar a estrutura genética de populações de plantas (ALFENAS, 1998). O interesse no uso de marcadores é importante devido ao fato destes poderem ser empregados para quantificar a variabilidade genética, descrever como esta se distribui entre e dentro de populações e como esta variabilidade pode ser manipulada (ROBINSON, 1998).

Por isso, a proposta do presente estudo foi padronizar os procedimentos tanto de análise de isozimas esterases como de malato desidrogenase e fosfatase ácida para estimar a diversidade genética e o nível de diferenciação entre as populações de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis*. Estas informações poderão orientar o manejo e o controle das populações destas duas espécies de plantas daninhas que crescem em culturas de importância econômica e que estão tornando-se resistentes ao emprego de herbicidas. Atualmente, plantas daninhas resistentes estão distribuídas por mais de 20 estados americanos, e em mais de 40 países do mundo (HEAP, 2010). No Brasil, os primeiros casos de resistência foram detectados no Rio Grande do Sul em 2005, e desde então estes biótipos rapidamente têm se dispersado em todos os estados da região sul e, mais recentemente, no centro-oeste e sudeste.

2 OBJETIVOS

2.1 Estabelecer o padrão das isozimas α - e β -esterases, malato desidrogenase e fosfatase ácida em exemplares de populações de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*;

2.2 Caracterizar a diversidade genética de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* usando as isozimas α e β -esterases, malato desidrogenase e fosfatase ácida;

2.3 Analisar se as populações de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* apresentam-se geneticamente estruturadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biologia e ecofisiologia de *Conyza*

O gênero *Conyza* inclui aproximadamente 50 espécies, distribuídas em quase todo o mundo (KISSMANN, GROTH, 1999). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo, são a *Conyza bonariensis* (L.) (ERIBO, buva) e *Conyza canadensis* (L.) (ERICA, buva), ambas são espécies da família Asteraceae. A primeira espécie é nativa da América do Sul e ocorre de forma abundante na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil. No Brasil, sua presença é mais intensa nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Ela também está presente na Colômbia e na Venezuela, onde infesta lavouras de café (KISSMANN, GROTH, 1999). *Conyza canadensis*, porém, é nativa da América do Norte (FRANKTON, MULLIGAN, 1987).

A propagação de *Conyza bonariensis* e de *Conyza canadensis* dá-se somente através de sementes, pois há modificações nos aquênios, chamadas de “papus”, para facilitar a dispersão de sementes pelo vento (ANDERSEN, 1993), porém pode ocorrer também pela água (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008). As duas espécies de “buva” são autocompatíveis e parecem não serem polinizadas por insetos (THEBAUD et al., 1996), embora existam estudos que demonstram que foram encontrados insetos visitando as flores abertas de *Conyza canadensis* (SMISEK, 1995).

As sementes de *C. canadensis* podem propagar-se pelo vento a distâncias superiores a 100m (DAUER, MORTENSEN, HUMSTON, 2006). Porém, à uma distância de 122m havia em média, 149 sementes m⁻² de um total de mais de 15.000 (LOUX et al., 2004). O número médio de sementes encontrado em *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* foi de 60 a 70 (SMISEK, 1995; THEBAUD, ABBOTT, 1995) e 190 a 550 por capítulo (WU, WALKER, 2004) respectivamente. Verificou-se que *C. canadensis*, numa densidade de 10 plantas m⁻², em área sem manejo do solo, produziu cerca de 200 mil sementes por planta (BHOWMIK, BEKECH, 1993) e que aproximadamente 80% delas germinaram próximo à planta mãe (LOUX et al., 2004). Com o aumento da densidade, o número de plantas que floresce, o tamanho individual da planta e o número de sementes por planta decresce, mas a produção global de sementes por unidade de área permanece praticamente constante (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008).

As sementes de “buva” não são dormentes e germinam sempre que houver condições favoráveis de temperatura e umidade (WU, WALKER, 2004). A temperatura mínima para a

germinação de sementes de *Conyza canadensis* foi estimada em 13°C (STEINMAUS et al., 2000) sendo que juntamente com a *Conyza bonariensis* germinam sob temperaturas entre 10 e 25°C (ZINZOLKER et al., 1985). Em um estudo realizado na Austrália constatou-se que a temperatura ótima para a germinação de *C. bonariensis* é de 20°C, todavia as temperaturas mínima e máxima foram estimadas em 4,2°C e 35°C (ROLLIN, TAN, 2006).

Um estudo demonstrou que houve 90% de queda na germinação de *Conyza canadensis* quando suas sementes foram enterradas a 1 cm abaixo da superfície do solo, comparadas a sementes posicionadas na superfície do solo (TREMMELE, PETERSON, 1983). Nandula et al. (2006) obteve resultado similar ao enterrar sementes da mesma espécie à profundidade maior que 0,5cm. Em outro estudo realizado nos EUA, constatou-se que em profundidade superior 6 cm, não foi obtida qualquer germinação de sementes de *C. canadensis* (BHOWMIK, BEKECH, 1993). Em um experimento realizado na Austrália, sementes de *C. bonariensis* emergiram na faixa de 1-2 cm abaixo da superfície do solo (WALKER, WIDDERICK, WU, 2004). Tais estudos inferem que a luz pode ser (ROLLIN, TAN, 2006) ou não ser (GÓRSKI, 1975) necessária para desencadear a germinação em *Conyza*.

Constatou-se que a germinação de sementes de *Conyza canadensis* foi maior quando houve período de luz durante o dia, porém em laboratório pode-se germinar estas sementes no escuro e, também, quando submetidas a períodos intercalados de 13h de luz e 11h de escuro (NANDULA et al., 2006). Lazaroto, Fleck, Vidal (2008) afirma que, o fato de agregar altos níveis de palha de culturas de cobertura à superfície do solo, impede e atrasa a germinação, dando tempo para que a cultura se estabeleça e suprima a população tardia de plantas que, eventualmente, venha a emergir. Cerca de 6 toneladas de palha de cobertura ha⁻¹ atrasou a germinação de sementes de *C. canadensis* em quatro semanas e reduziu a emergência total de plântulas em 80% (BHOWMIK, BEKECH, 1993). A germinação de sementes de *Conyza canadensis* ocorre, preferencialmente, em solos de pH neutro para alcalino (NANDULA et al., 2006). Portanto, a correção do solo deve ser realizada de modo que atenda as necessidades da cultura e não venha favorecer a “buva”, ou seja, de maneira equilibrada e não exagerada (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008).

Um ensaio laboratorial mostrou que as sementes de *Conyza canadensis* mantiveram-se apta a germinar por dois a três anos (HAYASHI, 1979). Contudo, existem relatos que informam

que foi encontrado um banco de sementes desta mesma espécie, numa área de pastagem abandonada, após a ausência de 20 anos desta (TSUYUZAKI, KANDA, 1996).

A espécie *Conyza canadensis* comporta-se como uma espécie anual ou bienal, dependendo das condições do ambiente (REGEHR, BAZZAZ, 1979; HOLM et al., 1997) e *Conyza bonariensis* como tipicamente anual (KISSMANN, GROTH, 1999). Em um estudo realizado na Austrália constatou-se que as plantas podem emergir durante todo o ano, mas que o pico de emergência ocorre durante a primavera (WALKER, WIDDERICK, WU, 2004). Mas estudos sugerem que a “buva” tolera muitos morfoclimas, porém a espécie *Conyza canadensis* é rara em regiões tropicais (HOLM et al., 1997). No Canadá, a produção de sementes de *Conyza* e seu potencial invasor tende a não ultrapassar a latitude 52°N (ARCHIBOLD, 1981). Entretanto, as duas espécies de *Conyza* toleram bem condições de deficiência hídrica e o uso de irrigações representa uma alternativa para melhorar a capacidade competitiva da cultura no processo competitivo com “buva” (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008). Como situações estressantes, Hanf (1983) relatou que a “buva” prefere solos acidentados e pedregosos, assim como áreas planas e úmidas, desde que não haja inundação do solo (SMITH, MOSS, 1998).

3.2 Distribuição e manejo de *Conyza*

A espécie *C. bonariensis* é nativa da América do Sul e ocorre de forma abundante na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil. Encontrada com uma maior frequência nas lavouras das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiro, ela está presente também na Colômbia e Venezuela (KISSMANN, GROTH, 1999). A *Conyza canadensis*, uma das espécies mais bem distribuídas globalmente (THEBAUD, ABBOTT, 1995), é nativa da América do Norte (FRANKTON, MULLIGAN, 1987). Encontrada predominantemente em regiões temperadas do hemisfério norte (HOLM et al., 1997) e regiões subtropicais do hemisfério Sul (KISSMANN, GROTH, 1999), *Conyza canadensis* está presente no Canadá (ROULEAU, LAMOUREUX, 1992), oeste da Europa (THEBAUD e ABBOTT, 1995), Japão e Austrália (HOLM et al., 1997).

Conhecidas como “buva”, essas duas espécies infestam áreas abandonadas, culturas perenes e lavouras anuais (soja, milho, algodão e trigo) (THEBAUD, ABBOTT, 1995). Um estudo realizado demonstrou que a espécie *Conyza canadensis* reduziu em 83% a produtividade de soja cultivada em semeadura direta na densidade de 150 plantas m² (BRUCE, KELLS, 1990).

Constatou-se a ocorrência de *Conyza* spp. em cultivares como cebola e cenoura, e que neste último cultivar seus efeitos na colheita são mais prejudiciais do que na produtividade da cultura (LEROUX et al., 1996). Em 63% das lavouras de soja cultivadas por dois anos seguidos, 51% das lavouras de soja sem rotação e 47% quando houve rotação entre soja e milho, foi encontrado infestações de “buva” no Estado de Indiana (EUA) (BARNES et al., 2004). A inclusão de cevada no inverno, como cultura de sucessão, reduziu as populações de *C. canadensis* em cebola e em cenoura no verão (LEROUX et al., 1996).

O aumento na intensidade do manejo do solo reduz a presença de *Conyza canadensis* em 50% ou mais (BUHLER, OWEN, 1997). Foram encontradas plântulas de *C. canadensis* em uma proporção de 61% nas lavouras que não receberam preparo do solo, comparado a 24% onde houve manejo reduzido do solo e a 8% em lavouras manejadas no sistema convencional (BARNES et al., 2004). Dessa forma, como as espécies não sobrevivem quando o solo é revolvido, este é um ponto que pode ser explorado para limitar as infestações em áreas agrícolas. Havendo impedimento para se revolver periodicamente o solo e considerando que no sistema de semeadura direta as sementes não são ou são pouco enterradas, pode-se utilizar esta característica para se obter germinação uniforme das populações, as quais poderiam ser eliminadas de forma mecânica (roçada) ou quimicamente (herbicidas) quando surgissem na área (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008)

Assim sendo, as práticas de manejo da “buva” requerem a combinação de múltiplas ações como aumento da intensidade de manejo do solo, uso rotineiro da rotação de culturas e adoção de técnicas culturais apropriadas (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008). Além disso, a identificação correta das espécies de *Conyza* é importante para que se possa escolher apropriadamente a melhor técnica de controle (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008).

3.3 Resistência a herbicidas

A resistência a herbicidas é a capacidade adquirida de uma planta ou biótipo sobreviver a determinados tratamentos herbicidas que, sob condições normais, controlam os demais integrantes da população. O uso repetido de uma molécula herbicida pode selecionar biótipos resistentes de plantas daninhas preexistentes na população, levando ao aumento do seu número (POWLES, HOLTUM, 1994). Em geral, espécies ou biótipos de uma espécie que melhor se

adaptam a uma determinada prática são selecionados e multiplicam-se rapidamente (HOLT, LEBARON, 1990). Evidências sugerem que o aparecimento de resistência a um herbicida em uma população de plantas se deve à seleção de genótipos resistentes preexistentes, que, devido à pressão de seleção exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida, encontram condições para multiplicação (BETTS et al., 1992)

O glifosato vem sendo usado há mais de 20 anos no manejo da vegetação, o glifosato que é um herbicida não seletivo vem sendo utilizado para formar a palhada no sistema de plantio direto. A crescente dependência de glifosato para o controle de plantas daninhas 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, 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 (Van GESSEL, 2001).

Atualmente, plantas resistentes estão distribuídas por mais de 20 estados americanos, e em mais de 40 países do mundo (HEAP, 2010). No Brasil, os primeiros casos de resistência foram detectados no Rio Grande do Sul em 2005, e desde então estes biótipos rapidamente têm 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 freqüente deste herbicida para controle de plantas daninhas, pouco ou nenhum uso de herbicidas alternativos que propiciem controle adequado de *Conyza*, e práticas de plantio direto de longa duração (LOUX et al., 2009).

Resistência de *Conyza* para outros herbicidas já está sendo descrita. Pesquisadores japoneses, em 1980, detectaram um biótipo de *C. canadensis* resistente ao herbicida paraquat (HEAP, 2010). O aumento da atividade de enzimas de detoxificação como a superóxido dismutase e/ou aprisionamento da molécula herbicida no local de detoxificação de enzimas está relacionado ao mecanismo de resistência ao paraquat (YE et al., 2000). Na Hungria, foram encontradas populações resistentes simultaneamente aos herbicidas paraquat e atrazine

(LEHOCZKI et al., 1984). Já em Israel e nos EUA, foram encontradas populações resistentes aos compostos atrazine e chlorsulfuron, sendo que este último é um inibidor da enzima ALS (HEAP, 2010).

Dentre as medidas preconizadas para o manejo da resistência de plantas daninhas aos herbicidas, a vigilância constante da lavoura, no sentido de identificar possíveis focos, é essencial e as plantas suspeitas devem ser sistematicamente eliminadas (LAZAROTO, FLECK, VIDAL, 2008).

3.4 Diversidade genética e o uso de Marcadores Moleculares

Conhecer a diversidade genética presente em populações de plantas daninhas representa um desafio para o manejo, primariamente porque esta variabilidade pode determinar a eficiência de vários métodos de controle. A quantificação da variabilidade genética pode ser realizada através do uso de marcadores moleculares ou bioquímicos, estudando seqüências de ácidos nucléicos ou isozimas. Os principais métodos usados para o manejo de plantas daninhas incluem o biológico, químico, cultural e físico (RADOSEVICH, HELT, GHERSA, 1997).

O sucesso dos programas de manejo de plantas daninhas está associado com a variabilidade genética, em função disto são originadas duas principais questões. 1- A seleção de plantas daninhas está sendo imposta pelo manejo? A intensidade de pressão de seleção condicionada pela prática da agricultura é considerada mais forte do que aquela imposta pelo ecossistema natural (BARRET, 1988; LINHART, GRANT, 1996). Deste modo é certo que as plantas daninhas evoluíram e continuarão a evoluir em resposta às atividades agrícolas (RADOSEVICH, HELT, GHERSA, 1997). 2- O sucesso dos programas de manejo está associado com a variabilidade genética das plantas daninhas? Espécies colonizadoras, incluindo plantas invasoras exóticas, geralmente têm baixos níveis de variação genética, pois sofrem um gargalo após a sua introdução (BARRET, 1988; WARWICK, 1990). Apesar do baixo nível de variabilidade, muitas daninhas exóticas colonizam muito bem novas áreas. Variação genética de plantas daninhas é em geral avaliada em *loci* neutros, mas estes não indicam necessariamente o nível de variação para todos os *loci* 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); mas somente cerca de 1% de todas as

espécies de plantas introduzidas tornam-se invasoras (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2002).

Populações de plantas em seu ambiente nativo geralmente possuem maior variabilidade genética do que populações de espécies exóticas invasoras, pois raramente são introduzidos todos os possíveis genótipos em um novo ambiente. Deste modo, plantas invasoras nativas comumente apresentam desafios para o manejo, por causa de sua grande variabilidade genética (STERLING et al., 2004). Assim, se variação genética entre populações afeta o sucesso no manejo de plantas daninhas, plantas invasoras nativas apresentariam a forma mais difícil de controle, pois elas possuem maior variabilidade genética do que espécies exóticas. A investigação da eficácia dos vários métodos de manejo em populações de plantas invasoras nativas pode ser importante para fornecer informações sobre o papel da variabilidade no sucesso do manejo, uma vez que estas plantas apresentam alto grau de variabilidade genética (STERLING et al., 2004).

A análise de produtos de diferentes *loci* em tecidos das plantas daninhas pode ser útil para estimar a variabilidade genética dentro de cada população e entre populações diferentes (PARK, 2004). Em estudos que buscam detectar *loci* polimórficos com o objetivo de estimar a diversidade genética em espécies vegetais usando marcadores bioquímicos, o sistema esterase tem sido usual e prioritariamente adotado como marcador genético-bioquímico; em vários trabalhos (MANGOLIN, PRIOLI, MACHADO, 1997; RESENDE et al., 2004; SOUZA, MACHADO, RESENDE, 2000; PEREIRA et al., 2001; ORASMO et al., 2003) foram demonstrados que as isozimas α - e β -esterases são produzidas por vários e diferentes *loci* que apresentam, na sua maioria, herança co-dominante, tratando-se, portanto, de um sistema enzimático adequado para estimar a diversidade genética e para analisar a estrutura genética de populações de plantas (ALFENAS, 1998). As isozimas esterases foram caracterizadas por um alto grau de polimorfismo e foram, por isso, amplamente investigadas em abordagem de genética de populações (KAHLER, ALLAD, 1970; HVID, NIELSEN, 1977; PAYNE, KOSZYKOWSKI, 1978; TANKSLEY, RICK, 1980; KAHLER, 1981; REBORDINOS, DE LA VEJA, 1989).

No caso das plantas daninhas, pouco se sabe sobre sua diversidade genética e sobre a estrutura das populações das principais espécies (BODO SLLOTA, 2008). Para estudo de plantas daninhas, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi estabelecida por Frigo et al. (2009) e foi eficiente para analisar a diversidade genética e a estrutura das populações de *E. heterophylla*. A análise da diversidade genética em 40 populações de *E. heterophylla* que

crecem no planalto do Rio Grande do Sul, resistentes aos herbicidas inibidores de ALS, mostrou que estas populações apresentam variabilidade genética de 60%. Esta variabilidade permitiu o agrupamento das plantas resistentes em sete grupos diferentes (WINKLER, VIDAL, NETO, 2003). O estudo de diversos acessos de *Euphorbia spp.* do continente Norte Americano e Eurásia (NISSEN et al., 1992) mostrou que 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. O estudo da variabilidade genética do complexo *Bidens pilosa* L. (picão-preto), empregando 10 sistemas de isozimas, revelou 16 *loci* 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%.

A variabilidade genética entre seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala*) foi avaliada por meio de métodos multivariados, utilizando-se caracteres isozimáticos 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 aos nove meses após o transplante das mudas. Em relação à análise isoenzimática, apenas o sistema esterase, entre os estudados, apresentou resolução, e os resultados possibilitaram a formação de 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 foi verificado em *Baccharis myriocephala*, este marcador foi utilizado para a caracterização de variedades desta espécie em complementação a características morfológicas.

É possível, portanto, que a partir do agrupamento de diferentes populações e da resposta destes agrupamentos em relação à susceptibilidade aos herbicidas, possa se atingir recomendações diferenciadas para manejo destas populações. Como descrito acima, o sistema de esterases apresenta potencial de utilização como ferramenta descritora de acessos de plantas daninhas e, por conseqüência, da estrutura de suas populações.

Marcadores genéticos podem guiar os pesquisadores de plantas daninhas, fornecendo indícios para o estudo de muitos aspectos das invasoras, herdabilidade para características (resistência a herbicidas), relação taxonômica, ponto de origem e fluxo de genes. Conhecer a diversidade em nível de populações e de espécies é importante para o manejo de plantas daninhas, o sucesso da invasão é dependente dos gargalos genéticos, “fitness” e número de eventos de introduções (GOOLSBY et al., 2006; STERLING et al., 2004). A obtenção de informações genéticas sobre plantas daninhas é vital para o desenvolvimento de opções de controle (BODO SLOTTA, 2008). Segundo este autor, marcadores moleculares tem sido freqüentemente usado para identificar e acompanhar genes de resistência em plantas daninhas.

De maneira geral, estudos empregando isozimas (BARRET, 1992), RAPD e AFLP (OKUNO et al., 1998; PESTER et al., 2003), RAPD e ISSR (LI, WANG, WANG, 2006) têm evidenciado que muitas populações de plantas daninhas contêm baixa diversidade genética, e que a estimativa da diversidade é idêntica tanto quando avaliada através 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 com o “efeito gargalo”, associado ao fundador, pequeno tamanho da população, endocruzamento, forte seleção direcional e falta de mecanismos de dispersão para grandes distâncias (WARWICK, 1990). Mengistu et al., (2005) utilizaram microssatélites, e estudaram as diferenças genéticas entre populações de *Avena fatua* L. do norte de Dakota resistentes e suscetíveis a herbicidas. Os resultados deste trabalho indicaram mínimas diferenças genéticas entre estas duas populações e que existe múltiplas origens de resistência.

4 REFERÊNCIAS

ADEGAS, F.S. Manejo integrado de plantas daninhas em plantio direto. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE MANEJO E CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS EM PLANTIO DIRETO. Passo Fundo. **Resumos**. Passo Fundo. Aldeia Norte Editora. p.17-26, 1998.

ALFENAS, A.C. Eletroforese de isozimas e proteínas afins - fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, UFV, p.574, 1998.

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

ANDERSEN, M.C. Diaspore morphology and seed dispersal in several Wind-dispersed Asteraceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v.80, p.487-492, 1993.

ARCHIBOLD, O.W. Buried viable propagules in native prairie and adjacent agricultural sites in central Saskatchewan. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.59, p.701-706, 1981.

BARNES, J.; JOHNSON, B.; GIBSON, K.; WELLER, S. **Crop rotation and tillage system influence late-season incidence of giant ragweed and horseweed in Indiana soybean**. 2004. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/brief/2004/late/>>. Acesso em 19 abr. 2010.

BARRET, S.C.H. Genetics and evolution of agricultural weeds. In: M.A. ALTIERI AND M. LIEBMAN, EDS. WEED MANAGEMENT IN AGROECOSYSTEMS: ECOLOGICAL APPROACHES. Boca Raton, FL, CRC. p.57-75, 1988.

BARRET, S.C.H. Genetics of weed invasions. In: S.K. JAIN; L.W. BOTSFORD, EDS. APPLIED POPULATION BIOLOGY. **Kluwer Academic Publishers**, Netherlands, p.91-119, 1992.

BARROSO G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. v.2, p.377, 1984.

BETTS, K.J. ; EHLKE, N.J.; WYSE, D.L.; GRONWALD, J.W.; SOMERS, D.A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Science**. v.40, p.184-189, 1992.

BHOWMIK, P.C.; BEKECH, M.M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy**, New York, v.1, p.67-71, 1993.

BODO SLOTTA, T.A. What we know about weeds: insights from genetic markers. **Weed Science**. v.56, p.322–326, 2008.

BRUCE, J.A.; KELLS, J.J. Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v.4, p.642-647, 1990.

BUHLER, D.D.; OWEN, M.D.K. Emergence and survival of horseweed (*Conyza Canadensis*). **Weed Science**, Lawrence, v.45, p.98-101, 1997.

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

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**, v.26, p.195-198, 2003.

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**, v.20, p.33-37, 2002.

DAUER, J.T.; MORTENSEN, D.A.; HUMSTON R. Controlled experiments to predict horseweed (*Conyza Canadensis*) dispersal distances. **Weed Science**, Lawrence, v.54, p.484-489, 2006.

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

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília, DF, Embrapa-Cenargen, p.220, 1998.

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

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.631, 1992.

GOOLSBY, J. A., DE BARRO, P. J.; MAKINSON, J. R.; PEMBERTON, R. W.; HARTLEY, D. M.; FROHLICH, D. R. Matching the origin of an invasive weed for selection of a herbivore haplotype for a biological control program. **Molecular Ecology**. v.15, p.287–297, 2006

GÓRSKI, T. Germination of seeds in the shadow of plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.34, p.342-346, 1975.

GRODZICKER T.; WILLIAMS J.; SHARP P.; SAMBROOK J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.39, p.439-466, 1975.

GROMBONE-GUARATINI M. T.; SILVA-BRANDÃO K. L.; SOLFERINI V. N.; SEMIR J.; TRIGO R. Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae:

Heliantheae) from southeast of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.33, p.479-486, 2005.

HANF, M. **The arable weeds of Europe with their seedlings seeds**. Ludwigshafen: BASF Aktiengesellschaft. p.494, 1983.

HAYASHI, I. Secondary succession of herbaceous communities in Japan: seed germination and shade tolerance as seedlings of the dominants. **Bulletin Yokohama Phytosociological Society of Japan**, Yokohama, v.16, p.407-419, 1979.

HEAP I. **International survey of herbicide-resistant weeds**. Disponível em <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em 19 de Abr. 2010.

HOLT, J.S.; LEBARON, H.M. Significance and distributions of herbicide resistance. **Weed Technology**., v.4, p.141-149, 1990.

HOLM, L.; DOLL, J.; HOLM, E.; PNANCHO, J.; HERBERGER, J. **World weeds: Natural histories and distribution**. Toronto: John Wiley e Sons, p.226-235, 1997

HVID, S.; NIELSEN, G. Esterase isoenzyme variants in barley. **Heredity**, v.87, p.155-162, 1977.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo. Companhia Editora Nacional, 1998.

KAHLER, A.L.; ALLAD, R.W. Genetics of isozymes variants in barley I. Esterases. **Crop Science**, v.10, p.444-448, 1970.

KAHLER, A.L. Worldwide patterns of genetic variation among four esterase *loci* in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.59, p.101-111, 1981.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, v. 2. p.978, 1999.

LAMEGO, F.P., VIDAL, R.A. Resistência ao Glyphosate em biótipos de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, v.26, p.467-471, 2008.

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

LEHOCZKI, E.; LASKAY, G.; PÖLÖS E.; MIKULÁS J. Resistance to triazine herbicides in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 32, p.669-674, 1984.

LEROUX, G.D.; BENOÎT, D-L.; BANVILLE, S. Effect of crop rotations on weed control, *Bidens cernua* and *Erigeron Canadensis* populations, and carrot yields in organic soils. **Crop Protection**, Oxford, v.15, p.171-178, 1996.

LI, W.; WANG, B., WANG, J. Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. **Aquatic Botany**, v.84, p.176–180, 2006.

LINHART Y.B.; GRANT M.C. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. v.27, p.237-277, 1996.

LOUX, M.; STACHLER, J.; JOHNSON, B.; NICE, G.; DAVIS, V.; NORDBY, D. **Biology and management of horseweed**. 2004. Disponível em: <<http://www.ipm.uiuc.edu/pubs/horseweed.pdf>>. Acesso em 17 abr. 2010.

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

MACHADO, M.F.P.S. **Isozimas da desidrogenase málica em abelhas do gênero Plebéia: controle genético e dados populacionais.** São Paulo: Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Dissertação (Mestrado em Genética), p.147, 1982.

MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics.** v.35, p.189-204, 1997.

MENGISTU, L.W., MESSERSMITH, C.G., CHRISTOFFERS, M.J. Genetic diversity of herbicide-resistant and susceptible *Avena fatua* populations in North Dakota and Minnesota. **Weed Research.** v.45, p.413–423, 2005.

MONTEZUMA, M.C.; GALLI, A.J.B.; SPERANDIO, P.H.; MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Avaliação da suspeita de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros no estado de São Paulo. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2006, BRASÍLIA. RESUMOS DO XXV CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. Brasília: SBCPD/UNB/Embrapa Cerrados, v.25. p.564, 2006.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; GALLI, A.J.; MONTEZUMA, M.C.; MAROCHI, A.I.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de “buva” (*Conyza bonariensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25. 2006, Brasília. **Anais. Brasília:** SBCPD / UNB / Embrapa Cerrados, p.1-4, 2006.

MOREIRA, M.S., NICOLAI, M., CARVALHO, S.J.P., CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha,** v.25, p.157-164, 2007.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Predicting Invasions of Nonindigenous plants and plant pests**. Washington, D.C.National Academy. p.41-52 e 89-110, 2002.

NISSEN S. J.; MASTERS R. A.; LEE D. J.; ROWE M. L. Comparison of restriction-fragment-length-polymorphisms in chloroplast DNA of 5 leafy spurge (*Euphorbia* spp.) accessions. **Weed Science**. v.40, p.63-67, 1992.

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

ORASMO, G.R.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme diversity in RB (Republic of Brazil) sugarcane (*Saccharum* spp.) varieties. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v.25, p.213-219, 2003.

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**, p.101-164, 2001.

PARK, K.R. Comparisons of allozyme variation of narrow endemic and widespread species of Far East *Euphorbia* (Euphorbiaceae). **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.221-228, 2004.

PAYNE, R.C.; KOSZYKOWSKI, T.J. Esterase isoenzyme difference in seed extracts among soybean cultivars. **Crop Science**, v.18, p.557-559, 1978.

PEREIRA, A.J.; VIDIGAL-FILHO, P.S.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta*, Crantz infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Biochemical Genetics**, v.39, p.289-296, 2001

PEREIRA, A.J.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; VIDIGAL-FILHO, P.S.; MACHADO, M.F.P.S. SDS-PAGE detection of a specific marker in “Fécula Branca” cassava cultivar *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Acta Scientiarum**. Maringá, v.24, p.615-618, 2002.

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**. v.51, p.287-293, 2003.

POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry. Boca Raton, 1994.

RADOSEVICH, S.; HELT, J.; GHERSA C. **Weed ecology: implications of management**. New York, J. Wiley. p.69-102 e p.335-395, 1997.

REBORDINOS, L.; DE LA VEJA, M.P. Extent of genetic variability of endosperm esterases in *Triticum aestivum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.728-734, 1989.

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

RESENDE, A.G.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDIGAL FILHO, P.S. Esterase Polymorphism Marking Cultivars of *Manihot esculenta*, Cranz. **Brasilian Archivers of Biology and Tecnology**. Tecpar. v.47, p.347-353, 2004.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isozimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, p.329-380, 1998.

ROLLIN, M.J.; TAN, D. **Fleabane: first report of glyphosate resistant flax-leaf fleabane from western Darling Downs.** 2004. Disponível em: <http://www.weeds.rc.org.au/documents/fleabane_preceedings%20_mar_04.pdf> Acesso em 26 jun. 2010.

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

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**, v:45, p.446-454, 1997.

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

SMITH, M.; MOSS, J.S. An experimental investigation, using stomatal conductance and fluorescence, of the flood sensitivity of *Boltonia decurrens* and its competitors. **Journal of Applied Ecology**, Washington, v.77, p.791-804, 1998.

SOUZA, F.P.; MACHADO, M.F.P.S.; RESENDE, A.G. Esterase isozymes for the characterization of “unnamed” cassava cultivars (*Manihot esculenta*, Crantz). **Acta Scientiareum**. Maringá-Pr, v:22, p.275-280, 2000.

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

STERLING T.M.; THOMPSON D.C.; ABBOTT L.B. Implications of Invasive Plant Variation for Weed Management. **Weed Science**, v.18, p.1319-1324, 2004.

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

TANKSLEY, S.D.; RICK, C.M. Genetics of esterases in species of *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.56, p.209-219, 1980.

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

TREMMELE, C.D.; PETERSON, K.M. Competitive subordination of a piedmont old field successional dominant by an introduced species. **American Journal of Botany**. Columbus, v.70, p.1125-1132, 1983.

TSUYUZAKI, S.; KANDA, F. Revegetation patterns and seedbank structure on abandoned pastures in northern Japan. **American Journal of Botany**, Columbus, v.83, p.1422-1428, 1996.

Van GESSEL, M.J. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, Lawrence, v.49, p.703-705, 2001.

VARGAS, L. BIANCHI, M.A.; RIZZARDI, M.A.; AGOSTINETTO, D. DAL MAGRO, T. Resistência de *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, v.25, 2006, Brasília. **Resumos...** Londrina: SBCPD, p.540, 2006.

VARGAS, L., BIANCHI, M.A., RIZZARDI, M.A., AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, v. 25, p.573-578, 2007.

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

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

VARGAS, L., BIANCHI, M.A., RIZZARDI, M.A., AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, p.573-578, 2007.

VIDAL, R.A., KALSING, A., GOULART, I.C.G.R., LAMEGO, F.P., CHRISTOFFOLETI, P.J. Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, v.25, p.309-315, 2007.

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

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

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

WALKER, S.; WIDDERICK, M.; WU, H. “**Summary of discussion and recommendations**”. Fleabane workshop, Toowoomba, p. 3–4, 2004.

WARWICK S.I. Genetic variations in weeds – with particular reference to Canadian agricultural weeds. In: S. KAWANC, ED. **BIOLOGICAL APPROACH AND EVOLUTIONARY TRENDS IN PLANTS**. London Academic., p.3-18, 1990.

WEAVER, S.E. The biology of Canadian weeds; *Coniza Canadensis*. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.81, p.867-875, 2001.

WEED SCIENCE. **Glycines (g/9) resistant weeds by species and country**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Summary/>>. Acesso em 24 abr. 2010.

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. Brasília. v.38, p.1067-1072, 2003.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: Distribuição e Genética de biótipos do Estado do Paraná. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v.4, p.85-92, 2004.

WU, H.; WALKER, S. **Fleabane: fleabane biology and control**. 2004. Disponível em: <http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings%20_mar_04.pdf>. Acesso em 16 jun. 2010.

YE, B.; FALTIN, Z.; BEN-HAYYIM, G.; ESHDAT, Y.; GRESSE, J. Correlation of glutathione peroxidase to paraquat/oxidative stress resistance in *Conyza* determined by direct fluorometric assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Dan Diego, v.66, p.182-194, 2000.

ZINZOLKER, A.; KIGEL, J.; RUBIN, B. Effects of environmental factors on the germination and flowering of *Conyza albida*, *C. bonariensis* and *C. Canadensis*. **Phytoparasitica**, Jerusalem, v.13, p.229-230, 1985.

CAPÍTULO 2

O ARTIGO SERÁ ENVIADO PARA O PERIÓDICO WEED RESEARCH (VERSÃO EM PORTUGUÊS)

Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*

Alaim Anderson Fernandes Soares, Claudete Aparecida Mangolin, Rubem Silvério de Oliveira Jr., e Maria de Fátima Pires da Silva Machado^(*). Departamento de Biologia Celular e Genética. Universidade Estadual de Maringá. 87020-900 Maringá PR Brasil.

^(*) Autor para correspondência mfpsmachado@uem.br

2.1 Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*

2.2 Resumo

Polimorfismo de isozimas em populações de *Conyza*

No presente estudo foi utilizado o sistema PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e eletroforese em gel de amido para identificar e analisar polimorfismos para os *loci* de α - e β -esterases, malato desidrogenase e fosfatase ácida de plantas de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*, com a finalidade de caracterizar a diversidade genética destas espécies. *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* são popularmente conhecidas no Brasil como “buva”; elas são plantas daninhas comuns e anuais, essas duas espécies infestam áreas abandonadas, culturas perenes e lavouras anuais como a soja, o milho, o algodão e o trigo. O estudo e conhecimento da diversidade genética e da estrutura genética de população são elementos importantes para identificar as formas de manejo, e para orientar o desenvolvimento de planos efetivos de controle das plantas daninhas. Foram avaliados 7 *loci* de esterases, 5 para malato desidrogenase e 2 para fosfatase ácida. As frequências alélicas foram estimadas para os *loci* *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *mbMDH* e *ACP-2* e o polimorfismo avaliado foi de 50%. O valor positivo de F_{IS} indicou um déficit de heterozigotos (25,15%) ou um excesso de plantas homozigotas. Um baixo nível de diferenciação genética foi encontrado entre as plantas de *Conyza bonariensis* e de *Conyza canadensis*, sugerindo uma alta troca genética entre as duas populações. O F_{ST} calculado para estas populações foi de 0,0144 quando esterases foram avaliadas e de 0,0239 quando malato desidrogenase e fosfatase ácida foram avaliadas. Também foi evidente que existe uma deficiência de heterozigotos nas duas populações de *Conyza*, esta informação é dada pelo valor positivo de F_{IS} ($F_{IS} = 0,1484$ para as esterases e de 0,32 para MDH e ACP). Os valores positivos de F_{IS} indicam um déficit de heterozigotos, ou um excesso de plantas homozigotas. No presente estudo podemos informar que os programas de manejo desenvolvidos para uma das espécies de *Conyza* poderá ser eficaz para a outra, uma vez que um baixo nível de diferenciação genética foi detectado entre elas e que o conhecimento da diversidade genética é necessário para que o manejo diferencial ou específico possa ser efetivo no controle para a espécie.

Palavras-chave: *Conyza bonariensis*; *Conyza canadensis*; buva; isozimas; diversidade genética.

2.3 ABSTRACT

Polymorphism of isozymes in populations of *Conyza*

In this study PAGE system (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and starch gel electrophoresis had been used to identify and to analyze polymorphisms for *loci* of a- and b-esterases, malate dehydrogenase and acid phosphatase of *Conyza canadensis* and *Conyza bonariensis* plants, with the purpose to characterize the genetic diversity of these species. *Conyza canadensis* and *Conyza bonariensis* are known popularly in Brazil as “buva”. They are common annual weed and these two species infest abandoned areas, perennial cultures and annual farmings as soybean, maize, cotton and wheat. The study and knowledge of the genetic diversity and the structure of population genetics are important elements to identify the handling forms, and to guide of effective control planning of the above mentioned weed. Seven *loci* of esterases, 5 for malate dehydrogenase and 2 for acid phosphatase had been evaluated. Allele frequencies were estimated for the *loci* *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *mbMDH* and *ACP-2* and whereas polymorphism was estimated in 50%. F_{IS} positive rate showed a deficit of heterozygotes or an excess of homozygous plants. A low level of genetic differentiation was found between the plants of *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis*, high genetic exchange among the two populations has been suggested. The F_{ST} calculated for these populations was 0.0144 when esterases had been evaluated and 0.0239 when malate dehydrogenase and acid phosphatase had been evaluated. Also it was evident that a deficiency of heterozygotes in the two *Conyza* populations exists. F_{IS} positive rate showed a deficit of heterozygotes or an excess of homozygous plants. This information was given by the positive value of F_{IS} ($F_{IS} = 0.1484$ for esterases and 0.32 for MDH and the ACP). In the present study we can inform that the control planning developed for one of the *Conyza* species can be efficient for the other, since a low level of genetic differentiation was detected between them and that the knowledge of genetic diversity is necessary such that the either differential control planning or specific control planning can be effective in the control for the species.

Key words: *Conyza bonariensis*; *Conyza canadensis*; buva; isozymes; genetic diversity.

2.4 INTRODUÇÃO

Conyza bonariensis (L.) (ERIBO, buva) e *Conyza canadensis* (L.) (ERICA, buva) são espécies da família Asteraceae, com centro de dispersão nas Américas do Sul e Norte, respectivamente; são originárias dos Estados Unidos (Weaver *et al.*, 2001). Estas duas espécies apresentam ciclo de desenvolvimento anual, são extremamente prolíficas, podendo produzir até 200.000 sementes viáveis por planta; são espécies que se estabelecem em diversas condições climáticas e por isso formam infestações densas. As espécies de *Conyza* apresentam boa adaptabilidade em sistemas conservacionistas de solo, como: plantio direto, cultivo mínimo e áreas de fruticultura (Bhowmik e Bekech, 1993). O potencial para autopolinização da espécie aliada à grande produção de sementes facilmente dispersáveis são fatores que podem contribuir para a boa adaptabilidade ecológica, para a sobrevivência de biótipos resistentes de buva, e para as altas infestações nos sistemas conservacionistas de solo. Tanto a espécie *C. canadensis* como a espécie *C. bonariensis* são plantas de sucessão primária que se estabelecem em áreas perturbadas (Tremmel e Peterson, 1983), inclusive em lavouras, particularmente nos períodos de entressafra e em áreas onde é praticado o manejo reduzido do solo.

A espécie *C. bonariensis* é encontrada com uma maior frequência nas lavouras das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiro (Kissmann e Groth, 1999), enquanto que *C. canadensis* está presente no Canadá (Rouleau e Lamoureux, 1992), oeste da Europa (Thebaud e Abbott, 1995), Japão e Austrália (Holm *et al.*, 1997). A propagação de *C. bonariensis* e *C. canadensis* dá-se somente através de sementes, pelo vento (Andersen, 1993), ou pela água (Lazaroto *et al.*, 2008). Como um exemplo do efeito destas espécies nas culturas, tem-se que quando *C. canadensis* está presente em um cultivo de soja no sistema de semeadura direta em uma densidade de 150 plantas m⁻², ocorreu uma redução em 83% do rendimento de grãos de soja cultivada (Bruce e Kells, 1990).

O método de controle tradicional para as plantas de *Conyza* é realizado através de aplicações de herbicida. A aplicação de glyphosate é a principal ferramenta para o manejo destas plantas daninhas; entretanto plantas daninhas resistentes ao glyphosate têm aparecido nas culturas como um resultado do extensivo uso deste herbicida no controle destas plantas (Perez-Jones *et al.*, 2007). A evolução da resistência ao glyphosate tem ocupado claramente o espaço dos agrossistemas; este herbicida exerce uma forte e contínua pressão sobre as plantas daninhas. Em

pomares de citros foram identificados biótipos de *C. canadensis* resistentes ao glyphosate (Christoffoleti *et al.*, 2006; Montezuma *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2006); o mesmo ocorre com *C. bonariensis* em áreas de soja transgênica (Vargas *et al.*, 2006; Lamego e Vidal, 2007). A ocorrência de biótipos resistentes aos herbicidas indica a necessidade de técnicas de manejo integrado de plantas daninhas. Para realizar o manejo integrado de *C. canadensis* e *C. bonariensis*, é necessário conhecer, ou obter maiores informações sobre a diversidade genética e sobre a estrutura genética das populações destas espécies. A forma como as populações estão geneticamente estruturadas é um elemento importante e essencial para identificar formas de manejo, e para orientar o desenvolvimento de planos efetivos de controle das plantas daninhas.

A eletroforese de proteínas ou enzimas ainda é uma das mais simples e uma das melhores ferramentas para a análise de estrutura genética das populações; este marcador também é utilizado para detectar a fixação de alelos, ausência de heterozigotos em alguns *loci*, e para sugerir a presença de duas ou mais populações reprodutivamente isoladas e geneticamente divergentes (Allendorf e Luikart, 2007). Dentre os vários sistemas de enzimas, as isozimas esterases, que apresentam herança codominante, são marcadores adequados para a análise da estrutura genética de populações. Em vários organismos, os genes para estas enzimas estão organizados em famílias multigênicas (Oakeshott *et al.*, 1993; Robin *et al.*, 1996). Em trabalhos recentes, 14-16 esterases já foram detectadas para diferentes espécies de plantas usando eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Pereira *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Orasmo *et al.*, 2007). Alto número de *loci* para esterases em tecidos de plantas pode ser simultaneamente usado para a identificação de variação genética e análise de polimorfismo. Deste modo, o presente estudo utilizou o sistema PAGE não desnaturante e géis de amido para identificar, respectivamente, polimorfismos em *loci* de α - e β -esterases e em *loci* para malato desidrogenase e fosfatase ácida em tecidos de folhas de plantas de *C. bonariensis* e *C. canadensis* para a análise de diversidade genética e estrutura de populações.

2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* usadas no experimento foram obtidas de sementes germinadas em laboratório em vasos de 500 mL contendo solo estéril. As plantas foram mantidas em temperatura ambiente e regadas diariamente.

Para a avaliação das isozimas esterases (EST; EC 3.1.1._), malato desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) e fosfatase ácida (ACP; EC 3.1.3.2) foram utilizadas folhas de plantas de *C. bonariensis* e *C. canadensis*. Foram utilizados fragmentos de folhas (200 mg) que foram homogeneizados separadamente com bastão de vidro em microtubos para centrifuga. A homogeneização foi realizada utilizando 60 µL de solução de extração homogeneizadas em tubo para microcentrífuga, foi utilizado solução de extração preparada com tampão fosfato 1,0 M, pH 7,0 (890 µL), contendo PVP-40 5% (50 mg), EDTA 1,0 mM (10 µL), 0,5% de β-mercaptoetanol (5 µL), e glicerol a 10% (50 µL); a extração foi realizada em banho de gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Juan 23 MRi, a 25.000 r.p.m. (48.200 x g) por 30 minutos, em 4°C, e o sobrenadante (50 µL) foi utilizado para cada amostra.

Para a eletroforese de esterases, o gel de separação de Poliacrilamida (12%), foi preparado seguindo o protocolo descrito por Ceron, (1988). O gel foi preparado com Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 6,2 mL de solução de acrilamida e bis-acrilamida (30 g de acrilamida e 0,8 g de bis-acrilamida) dissolvidas em 100 mL de água bi-destilada, 4,0 mL de Tris-HCl a 1,5 M, pH 8,8, 5,7 mL de água bi-destilada, 320 µL de persulfato de amônia (2%), e 16 µL de TEMED. O gel de empilhamento foi preparado com 3,0 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida (5 g de acrilamida e 0,25 g de bis-acrilamida dissolvida em 50 mL de água bi-destilada), 3,0 mL de Tris-HCl 0,24 M, pH 6,8, 30 µL de água bi-destilada, 250 µL de persulfato de amônia (2%), e 3 µL de TEMED. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese, e esta foi realizada por 5h na temperatura de 4 °C, com uma voltagem constante de 200 V; para a passagem da corrente elétrica foi utilizada uma solução tampão preparada com Tris 0,125 M, glicina 0,0959 M, pH 8,3.

As esterases foram identificadas pelo método de coloração descrito por Johnson *et al.* (1966), Steiner e Johnson (1973) e modificado por Ceron (1988). Os géis foram incubados em 50 mL de solução tampão contendo fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,2 em temperatura ambiente por 30 min. A atividade das esterases foi visualizada nos géis após uma hora de coloração. A solução de coloração foi preparada com 50 mL do mesmo tampão fosfato, 40 mg de β-naftil acetato, 40 mg de α-naftil acetato, dissolvidos com 1 mL de acetona, 80 mg de Fast Blue RR salt, e 5 mL de N-propanol.

Os géis de poliacrilamida foram secos de acordo com informações descritas por Ceron *et al.* (1992) e Lapenta *et al.* (1995). Após a coloração, os géis foram fixados em temperatura ambiente durante 1-24 horas em solução que contendo ácido acético 7,5% e glicerol 1%; em

seguida, embebidos com gelatina 5%, e acondicionados entre duas folhas esticadas de papel celofane e secos por 24-48 horas.

Para analisar as isozimas malato desidrogenase e fosfatase ácida, após a centrifugação os sobrenadantes foram absorvidos em tiras de papel Whatman N°. 3 (5 X 6-mm), e estas foram inseridas verticalmente em géis de amido. O gel de amido 16% foi preparado com tampão tris/citrato pH 7,0 (Tris 0,0103 M e ácido cítrico 0,0028 M). Nas cubas contendo os eletrodos foi utilizado também tampão tris/citrato pH 7,0 (Tris 0,155 M e ácido cítrico 0,043 M). A eletroforese foi realizada em 4 °C por 16 horas, com 2,5 V/cm (Machado *et al.* 1993).

As isozimas MDH foram coradas com uma mistura de reação descrita por Machado *et al.* (1993). A solução de coloração foi preparada com 30 ml de tampão Tris/HCl 0,1 M, 300 mg de ácido málico e pH corrigido para 8,6, 10 mg de NAD (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo), 10mg MTT (thiazolyl blue), e 2 mg PMS (phenazine methosulfate) e 15 ml de solução de ágar 2%. O gel foi incubado no escuro em 37 °C por 30-60 min. As isozimas ACP foram visualizadas após 30 minutos em gel incubado em 37 °C com 50 ml de tampão citrato de sódio 0.1M, pH 5.0, ajustado com ácido acético, 4 ml de α -naftil fosfato 1% dissolvido inicialmente com acetona (preparado em 50 ml de acetona e com o volume completado para 100 ml com água), e 30 mg de fast blue RR salt. Após a coloração os géis de amido foram lavados e fixados em uma solução preparada com metanol, ácido acético e água destilada (5:5:1) por 3-5 min e enxaguados com água.

A variabilidade genética em populações de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* foi analisada utilizando o programa computacional POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Através deste programa fez-se a análise de frequências alélicas, heterosiguidade média observada e esperada (H_o e H_e), a média de números de alelos por *locus* (A), o número médio de alelos por *locus* polimórficos (AP), a porcentagem de *loci* polimórficos (%P), o teste do χ^2 para avaliar o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o índice de fixação (F_{IS}), a similaridade genética ou coeficiente de distância e as estatísticas F de Wright (1965) (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) para as 12 populações.

2.6 RESULTADOS

A análise de isozimas esterases de folhas de plantas de *Conyza*, com o método PAGE não desnaturante, utilizando como substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato revelou 7 *loci* de

esterases claramente definidos (Figura 1). Não foi possível identificar o número de isozimas esterases que apresentaram uma migração anódica mais lenta. As esterases α/β -esterases foram numeradas em ordem, começando do anodo como a EST-1 e seguindo de acordo com o decréscimo de cargas negativas. A esterase com migração mais lenta foi denominada EST-7 (Figura 1).

O fracionamento para malato desidrogenase em gel de amido evidenciou a presença de três grupos diferentes de isozimas malato desidrogenase, as de microcorpos (mbMDH), as mitocondriais (mtMDH) e as solúveis ou citosólicas (sMDH) (Figura 2). Dentre as malato desidrogenases de microcorpos foram evidentes 4 isozimas (mbMDH-1 e mbMDH-2, mbMDH-3 e mbMDH-4) codificadas por um *locus*, também foram evidenciados 2 *loci* para a malato mitocondrial (*mtMDH-1* e *mtMDH-2*) e foram evidentes 2 *loci* para a malato desidrogenase citosólica (*sMDH-1* e *sMDH-2*). Estas diferentes formas de malato desidrogenase foram designadas como 1 para a de menor peso molecular, portanto maior mobilidade no gel, e como 2 ou 4 para as isozimas com maior mobilidade no gel (Figura 2). Devido a complexidade de organização estrutural para estas enzimas, que inclui a capacidade de formação de heterodímeros entre produtos de alelos de *loci* mitocondriais e citosólicos diferentes, para a avaliação de variabilidade genética só foi possível a análise do *locus mbMDH*. Para este *locus* ficou evidente a presença de 4 alelos (Figura 2).

Para as isozimas fosfatases ácidas foram evidentes 2 *loci* (*ACP-1* e *ACP-2*), mas foi possível analisar somente o *locus ACP-2* com 4 alelos codificando as isozimas *ACP-2*¹, *ACP-2*², *ACP-2*³ e *ACP-2*⁴ (Figura 3).

Para os 3 sistemas isozimáticos foram detectados 14 *loci*, destes foram analisados 5 que codificam para esterases, 1 que codifica para malato desidrogenase e 1 para fosfatase ácida, totalizando 7 *loci*.

Para isoesterases dois a quatro alelos com variação foram detectados em tecidos de folhas tanto de plantas de *Conyza bonariensis* e de *Conyza canadensis*. As frequências alélicas foram analisadas para os *loci Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *mbMHD* e *ACP-2*. Deste modo a proporção de *loci* polimórficos estimada (%P) nas duas espécies de *Conyza* foi de 50%.

O polimorfismo para os *loci Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, e *Est-5* para as duas espécies de *Conyza* revelou que os alelos codificam formas monoméricas para as esterases; a isozima mais lenta para a esterase 1, foi denominada de EST-1⁴ e a mais rápida EST-1¹, este exemplo pode ser

visto na Figura 1, as amostras 8 e 12 apresentam a EST-1¹; a EST-1² é observada nas amostras 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11 e 12; a EST-1³ pode ser observada nas amostras 2 e 10 e a EST-1⁴ pode ser observada na amostra 5, todas estas amostras podem ser vistas na Figura 1.

Na Tabela 1 estão apresentadas as proporções de alelos por *loci* (A), a proporção de alelos por *loci* polimórficos (AP), a heterozigidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas 2 populações de *Conyza* para os *loci* analisados. A heterozigidade observada (H_o) para esterases de plantas de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* foi de 0,4310 e 0,4293 respectivamente, este valor é menor que o valor para a heterozigidade esperada (H_e), que para esterase foi de 0,5125 e 0,4978. O déficit de heterozigotos foi maior quando as plantas de *Conyza* foram avaliadas para os *loci* *mbMHD* e *ACP₂*. Para *Conyza canadensis* a heterozigidade observada (H_o) foi de 0,4410 e a esperada (H_e) foi de 0,6699. Para a *Conyza bonariensis* a heterozigidade observada foi de 0,4333 (H_o) e a esperada (H_e) de 0,6149.

Para os 14 testes realizados na verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg nas 2 populações, foi observado o equilíbrio somente para 6 deles (42,86%), (resultados apresentados na tabela 2), a ausência de equilíbrio para os *loci* analisados é resultado de um déficit de indivíduos heterozigotos. O valor do índice de fixação (F_{IS}) foi positivo para os *loci* *Est-1* *Est-2*, *Est-4*, *mbMDH* e *ACP₂*. Para as duas populações a heterozigidade observada (H_o) foi menor que a esperada (Tabela 2) indicando a falta de heterozigotos para as populações de *Conyza*.

Um nível baixo de diferenciação populacional foi encontrado para as 2 populações de *Conyza* tanto quando foram avaliadas as isozimas esterases ($F_{ST} = 0,0137$) como quando foram avaliadas as isozimas malato desidrogenase e fosfatase ácida ($F_{ST} = 0,0239$); este resultado sugere uma ampla troca genética (N_m) entre as populações de *C. canadensis* e *C. bonariensis* que foi avaliada em 18,008 e 10,203 para os *loci* de esterases e para os *loci* malato desidrogenase e fosfatase ácida respectivamente. O valor de F_{ST} indicou que 1,4 e 2,4% da variância total para a frequência dos alelos de esterase, malato desidrogenase e fosfatase ácida, respectivamente, em populações de *Conyza* ocorreram em função das diferenças genéticas entre as populações. De acordo com esta informação, as estimativas do nível de fluxo gênico calculado para F_{ST} foi alto $N_m = 18,008$ e 10,203 (Tabela 2). O padrão de migrações de alelos ou a troca de alelos entre as populações pode ter contribuído para manter a homogeneidade entre as duas populações de *Conyza*. Estas informações sugerem que as duas espécies apresentam a mesma origem genética com baixo nível de diferenciação entre as plantas das duas espécies de *Conyza*.

Outro parâmetro que mostra a baixa diferenciação entre as duas espécies de *Conyza* foi o valor obtido para a identidade de Nei (I) quando quantificada com esterase o valor foi de 0,97 e quando quantificada com malato desidrogenase e fosfatase ácida foi de 0,91.

2.7 DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam uma prévia hipótese de que PAGE pode ser considerada como um sistema adequado para a análise das isozimas α - e β -esterases dos tecidos de folhas das plantas de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis*, uma vez que sete *loci* para estas isoesterases foram simultaneamente e claramente evidentes na mesma eletroforese, isto é, utilizando somente um sistema enzimático. Os sistemas enzimáticos da malato desidrogenase e fosfatase ácida, também podem ser considerados como adequados. Embora o número de *loci* evidente nestes dois sistemas seja relativamente menor do que o descrito para as esterases no sistema PAGE, o polimorfismo das isozimas MDH e ACP contribuíram para as estimativas da diversidade genética e análise da estrutura de populações das duas espécies de *Conyza*.

A diversidade genética encontrada a partir da análise dos polimorfismos de esterases, MDH e ACP no nosso estudo com *C. bonariensis* e *C. canadensis* pode ser consideradas como alta, pois dos 14 *loci* analisados foi possível estabelecer o polimorfismo para 7 deles, totalizando 50% de *loci* polimórficos igualmente para as 2 espécies. Este ainda é um valor subestimado, pois os polimorfismos para os *loci* de malato desidrogenase solúvel e mitocondrial, assim como para o *locus ACP-1*, não foram aqui relatados. Portanto, o valor de polimorfismo para *C. bonariensis* e *C. canadensis* é muito maior do que o valor médio da proporção descrita para dicotiledôneas (31%) (Hamrick *et al.*, 1979) e também para outras espécies de plantas daninhas como *Euphorbia* (Park, 2004; Frigo *et al.* 2009).

Por outro lado, um valor mais baixo da proporção de *loci* heterozigotos observados (H_o), em relação ao esperado (H_e) foi encontrado na análise de ambas as espécies de *Conyza*. O valor de H_o e de H_e para os diferentes *loci* de esterase foram respectivamente 0,4301 e 0,5123, e para os *loci* de malato desidrogenase e de ACP foram de 0,4529 e 0,6614 nas 2 diferentes populações de *Conyza*; estes valores indicam que estas populações não estão geneticamente estruturadas.

A frequência para os alelos nas 2 populações é bastante homogênea, isto é, a distribuição de alelos para todos os *loci* analisados não apresenta distribuição preferencial em qualquer uma

das populações analisadas. Esta homogeneidade para a frequência de alelos entre as duas populações justifica a pequena divergência genética existente entre as duas espécies. Esta baixa divergência entre *C. bonariensis* e *C. canadensis* é avaliada pelo valor de F_{ST} . Este valor foi de 0,0144 quando esterases foram avaliadas e de 0,0239 quando malato desidrogenase e fosfatase ácida foram avaliadas. Estes valores para o F_{ST} indicam um baixo nível de divergência genética entre as duas populações. De acordo com Wright (1978) valores de $F_{ST} < 0,05$ indicam uma baixa diferenciação genética entre populações.

As estimativas obtidas no presente estudo conduzem a uma proposição de que não existe isolamento reprodutivo entre as duas espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis*. A falta de diferenciação genética pode indicar troca de alelos entre as duas populações, e possivelmente isto pode ocorrer em razão destas plantas ocuparem o mesmo espaço por longo período de tempo. Esta troca de alelos ou de genes é evidente, pois os valores de fluxo gênico (Nm) são grandes, com um fluxo de 10,20 para malato desidrogenase e fosfatase ácida e de 17,05 para esterases. Deste modo a baixa diferenciação genética entre as populações de *C. bonariensis* e *C. canadensis* é reforçada pelo alto fluxo gênico. Quando os aspectos reprodutivos desta espécie são levados em consideração, esperaríamos uma maior diferenciação entre elas, pois as duas espécies de *Conyza* são autocompatíveis e, aparentemente não são polinizadas por insetos, sugerindo a ocorrência de autogamia ou polinização pelo vento (Thebaud *et al.*, 1996). *Conyza canadensis* é autocompatível (Mulligan e Findlay, 1970); o pólen é liberado antes que os capítulos se abram inteiramente, sugerindo autopolinização, embora os insetos visitem as flores abertas (Smisek, 1995). Porém quando Smisek (1995) utilizou plantas resistentes ao herbicida paraquat como marcadoras, constatou que o nível de autocruzamento dentro de uma população de *C. canadensis* foi de 4% aproximadamente (variando de 1,2 a 14,5%). Portanto, além da forma de autocruzamentos não ser a forma mais freqüente de reprodução para estas espécies, uma forma de explicar esta baixa diferenciação entre elas é a capacidade de ocorrência de hibridização entre as espécies *C. canadensis* e outras do gênero *Conyza*, principalmente *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*, pois estas geralmente crescem em populações associadas e ocorrem de forma freqüente (Thebaud e Abbott, 1995). Uma pequena diferença para a variação genética entre as diferentes populações, pode indicar uma grande dispersão espacial ou uma recente perturbação na variação genética causada por ações humana (Allendorf e Luikart, 2007).

Tanto a convivência espacial por longo período, como a capacidade de ocorrência de hibridização e populações freqüentemente perturbadas pela interferência humana, podem determinar o baixo nível de diferenciação espacial entre as duas espécies de *Conyza*. Distúrbios de pequenas escalas tais como o constante uso de herbicidas pode criar um aumento na homogeneidade espacial. Alta pressão de seleção adotada no manejo convencional de plantas daninhas, tem causado seleção para biótipos resistentes (Holt e LeBaron, 1990) e é possível que este fato determine a forma de seleção para populações com baixa diferenciação dentro da espécie.

A deficiência de heterozigotos nas 2 populações de *Conyza* pode ser evidente através do valor positivo de F_{IS} ($F_{IS} = 0,1484$ para as esterases e de $0,32$ para MDH e ACP). Os valores positivos de F_{IS} indicam um déficit de heterozigotos, ou um excesso de plantas homozigotas. Este evento poderia ser resultante da pressão de seleção imposta pelo homem (freqüente aplicação de herbicida) em culturas de soja e/ou ser resultante de autopolinização que é um evento descrito para a espécie. Através dos significantes valores de F_{IT} ($F_{IT} = 0,1607$ para esterases e $0,3363$ para MDH e ACP), constata-se que a constante autofecundação ou cruzamentos não casuais observados têm um papel fundamental na forma da estrutura genética destas populações de *C. bonariensis* e *C. canadensis*. Esta evidência é um aspecto importante porque um aumento na homozigose pode levar à expressão de um grande número de alelos recessivos e deletérios em plantas autofecundadas, e com isto pode ocorrer nestas plantas uma diminuição do seu *fitness*. A redução da heterozigosidade reduz o *fitness* de indivíduos em *loci* onde a heterozigosidade oferece uma relativa vantagem sobre a homozigose (Allendorf e Luikart, 2007). Por outro lado, a alta heterozigosidade encontrada nas populações de *C. bonariensis* e *C. canadensis* pode indicar que estas populações de plantas têm substancial quantidade de variações genéticas adaptativas, e estas variações podem ser suficiente para que elas possam escapar dos efeitos de um agente controle.

O nível de divergência genética interpopulacional nas espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis* está refletido nos valores de identidade genética de Nei (I) das 2 populações. O valor de I mostra que existe baixa diferenciação genética entre as duas espécies de *Conyza*. O nível de divergência genética pode ser utilizado no desenvolvimento de políticas de manejo e controle das espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis*; este pode ser um importante passo para o desenvolvimento de novas estratégias para o mecanismo de controle de *Conyza*. Para as

populações como *C. bonariensis* e *C. canadensis*, que apresentam alto valor de identidade genética é possível adotar mecanismos e processos similares para o seu controle.

O estudo da diversidade genética em espécies de *Conyza* é necessário uma vez que na literatura não existe qualquer informação a respeito deste parâmetro, grande parte das informações obtidas com este gênero estão associadas com a descrição de populações resistentes, com a ação de diferentes herbicidas e com a elucidação de mecanismos que conferem resistência a este gênero. Estas informações são importantes uma vez que atualmente há seis países com biótipos de *C. bonariensis* resistentes aos herbicidas e 13 países com biótipos de *C. canadensis* resistentes aos herbicidas (Heap, 2010). Biótipos de ambas as espécies também já foram relatados como resistentes ao glifosato no Brasil (Christoffoleti *et al.*, 2006; Montezuma *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2006) e confirmados por Lamago e Vidal (2008). O conhecimento da diversidade genética e da estrutura das populações é necessário para direcionar os programas de manejo que poderão ser aplicados de forma diferencial ou específico, tornando-se assim efetivos no controle para as espécies do gênero *Conyza*.

A análise para esterases, malato desidrogenase e fosfatase ácida no presente estudo descreveu alta diversidade genética para as espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis*, baixa diferenciação genética entre elas, e apresentou que o entendimento do comportamento genético das espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis* é importante para que um manejo de controle particular possa ser desenvolvido. No presente estudo podemos informar que os programas de manejo desenvolvidos para uma das espécies poderá ser eficaz para a outra, uma vez que um baixo nível de diferenciação genética foi detectado entre elas. De fato, o conhecimento da diversidade genética é necessário para o manejo diferencial ou específico que possam ser efetivos no controle para a espécie.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allendorf FW & Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing Maden, Massachusetts, 642 p.
- Andersen MC (1993) Diaspore morphology and seed dispersal in several Wind-dispersed Asteraceae. *American Journal of Botany* **5**, 487-492.

- Bhowmik PC & Bekech MM (1993) Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). Agronomy, New York, p 67-71.
- Bruce JA & Kells J. (1990) Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. *Weed Technology*, Champaign **4**, 642-647.
- Carvalho VM, Marques RM, Lapenta AS & Machado MFPS (2003) Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). *Genetics and Molecular Biology* **26**, 195-198.
- Ceron CR (1988) Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. Doctoral Thesis. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 142 p.
- Ceron CR, Santos JR, Campos BHEM (1992) The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Brazilian Journal Genetics* **15**, 201-203.
- Christoffoleti PJ, Montezuma MC, Galli AJB, Sperandio PH, Moreira M.S & Nicolai M (2006) Herbicidas alternativos para o controle de biótipos de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* supostamente resistentes ao herbicida glyphosate. In: *Resumos do XXV Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*. Brasília: SBCPD/UNB/Embrapa Cerrados, **25** 553-553.
- Frigo MJ, Mangolin CA, Oliveira JRRS & Machado MFPS (2009) Esterase polymorphism for analysis of genetic diversity and structure of wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) populations. *Weed Science*, **57** 54-60.
- Hamrick JL, Linhart YB & Mitton JB (1979) Relationship between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **10** 173-200.
- Heap I. International survey of herbicide-resistant weeds. Disponível em <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 19 de Abril, 2010.
- Holm L, Doll J, Holm & Pnacho J & Herberger J (1997) *World weeds: Natural histories and distribution*. Toronto: John Wiley e Sons. p. 226-235.
- Holt JS & LeBaron HM (1990) Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology*, **4** 141-149.
- Kissmann KG & Groth D (1999) *Plantas infestantes e nocivas*. 2. ed. São Paulo: BASF, **2** 978 p.

- Lamego FP & Vidal RA (2008) Resistência ao Glyphosate em biótipos de *Conyza bonariensis* E *Conyza canadensis* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Planta Daninha*, **26** 467-471.
- Lapenta AS, Campos Bicudo HEM, Ceron CR & Cordeiro JA (1995) Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios* **84**, 13-29.
- Machado MFPS, Prioli AJ & Mangolin CA (1993) Malate Dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) Isozymes in Tissues and Callus Cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) *Biochemical Genetics*, **3/4** 167-172.
- Montezuma MC, Galli AJB, Sperandio PH, Moreira MS, Nicolai M & Christoffoleti PJ (2006) Avaliação da suspeita de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros no estado de São Paulo. In: XXV Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2006, Brasília. Resumos do XXV Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. Brasília: SBCPD/UNB/Embrapa Cerrados, **25** 564p.
- Moreira MS, Nicolai M, Carvalho SJP & Christoffoleti PJ (2007) Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, **25**157-164.
- Mulligan GA & Findlay JN (1970) Reproductive systems and colonization in Canadian weeds. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, **5** 859-860.
- Oakeshott JG, Van Papeenrecht EA, Boyce TM, Healy MJ & Russell RJ (1993) Evolutionary genetics of *Drosophila esterases*. *Genetica* **90**, 239-268.
- Orasmo GR, Oliveira-Collet SA, Lapenta AS & Machado MFPS (2007) Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetylerase in grapes clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. *Biochemical Genetics*, **9/10** 663-670.
- Park KR (2004) Comparisons of allozyme variation of narrow endemic and widespread species of Far East Euphorbia (Euphorbiaceae). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **45** 221-228.
- Pereira AJ, Vidigal-Filho PS, Lapenta AS & Machado MFPS (2001) Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta*, Crantz infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Biochemical Genetics*, **39** 289-296.
- Perez-Jones A, Park KW, Polge N, Colquhoun J & Mallory-Smith CA (2007) Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* **226**, 395-404.

- Robin C, Russell RJ, Nedveczky KM & Oakeshott J (1996) Duplication and divergence of the genes of the alpha-esterase cluster of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Evolution* **43**, 241-252.
- Rouleau & Lamoureux G (1992) Atlas of the vascular plants of the island of Newfoundland and of the islands of Saint Pierre et Miguelon. Quebec: Group Fleurbec, 777p.
- Smisek AJ (1995). The evolution of resistance to paraquat in populations of *Erigeron canadensis* L.. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia-Ecologia) - University of Western Ontario, London, Ontario.
- Thebaud C, Finzi AC, Affre L, Debussche M & Escarre J (1996) Assessing Why Two Introduced *Conyza* Differ in Their Ability to Invade Mediterranean Old Fields. *Ecology*, **77** 791-804.
- Thebaud C & Abbott RJ (1995) Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *American Journal of Botany*, Columbus, **3** 360-368.
- Tremmel CD & Peterson KM (1983) Competitive subordination of a piedmont old field successional dominant by an introduced species. *American Journal of Botany*. Columbus, **8** 1125-1132.
- Vargas L, Bianchi MA, Rizzardi MA, Agostinetto D & Dal magro T (2006) Resistência de *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate. In: *Congresso Brasileiro Da Ciência Das Plantas Daninhas*, 25 Brasília. Resumos Londrina: SBCPD, p.540.
- Weaver SE (2001) The biology of Canadian weeds; *Conyza Canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, **4** 867-875.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**, 395-399.
- Wright S (1978) Variability within and among populations In: *Evolution and the genetics of populations*. Chicago, University of Chicago Press, v.4.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999) **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta, Centro for International Forestry Research.

Figura 1. Polimorfismo de α - e β -esterases produzido para os *loci* *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4* e *Est-5* detectado em 12 plantas de *Conyza canadensis*.

Figura 2. Fracionamento para a malato desidrogenase de microcorpos (mbMDH), mitocondriais (mtMDH) e as solúveis ou citosólicas (sMDH). Malato desidrogenase fracionada de plantas de *Conyza canadensis* (1-7) e de *Conyza bonariensis* (8-16). Polimorfismo para o *locus* *mbMDH* e as 4 isozimas codificadas por seus alelos (mbMDH-1 e mbMDH-2, mbMDH-3 e mbMDH-4). Evidencia dos *loci* que codificam para a malato desidrogenase mitocondrial (*mtMDH-1* e *mtMDH-2*) e para os 2 *loci* que codificam para a malato desidrogenase citosólica (*sMDH-1* e *sMDH-2*).

Figura 3. Polimorfismo de fosfatase ácida produzido para o *locus* *ACP-2* codificando para as isozimas *ACP-2*¹, *ACP-2*², *ACP-2*³ e *ACP-2*⁴. As amostras de 1 a 9 são plantas de *Conyza bonariensis*.

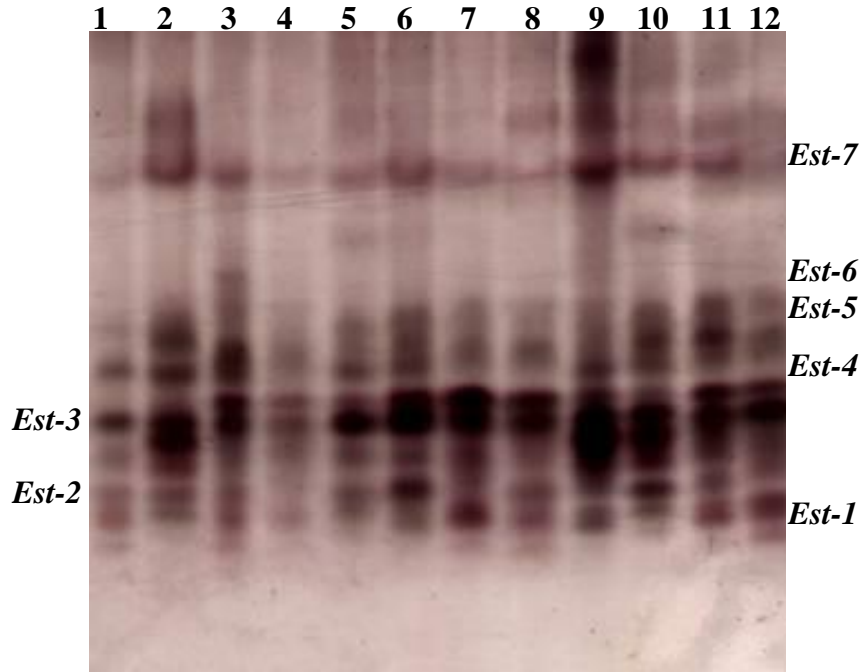


Figura 1

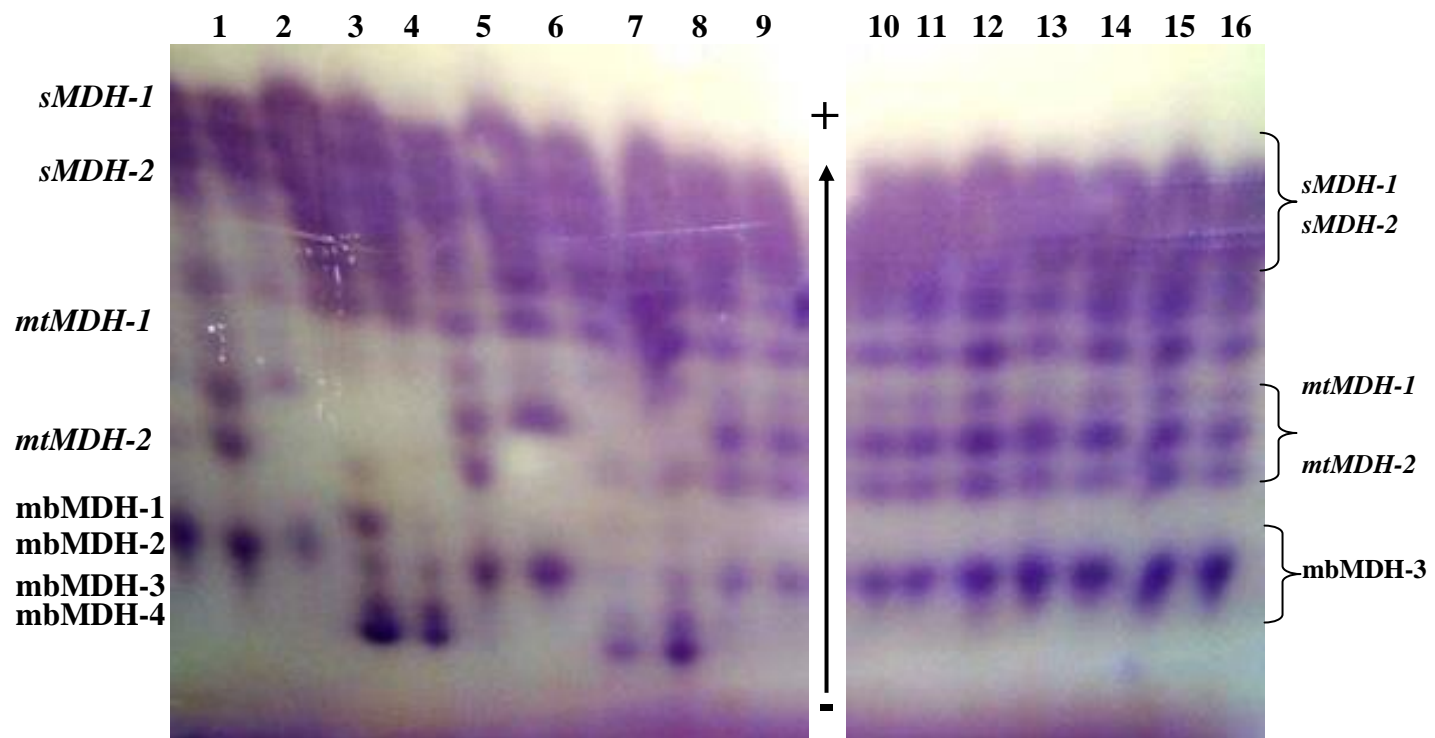


Figura 2

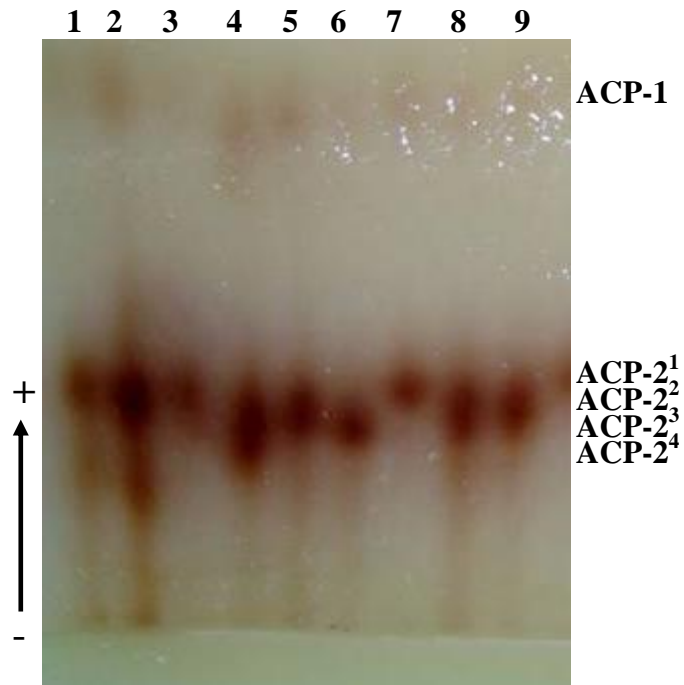


Figura 3

Tabela 1. Número de *loci* polimórficos ($N_{(pl)}$), proporção de *loci* polimórficos (%P), proporção de alelos por *locus* (A), proporção de alelos para os *loci* polimórficos (AP), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) em plantas de duas populações de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*.

	N	N(pl)	%P	AP	A	Ho	He
Esterases							
<i>Conyza bonariensis</i>	75	5	50	2,29	2,8	0,4293	0,4978
<i>Conyza canadensis</i>	71	5	50	2,18	2,8	0,431	0,5124
Total	146		50	2,28	2,8	0,4301	0,5119
mbMDH e ACP-2							
<i>Conyza bonariensis</i>	76	2	50	2,64	3,5	0,4333	0,6149
<i>Conyza canadensis</i>	86	2	50	3,06	3,5	0,441	0,6699
Total	162	7	50	3,0147	3,5	0,4529	0,6614

N = número de plantas analisadas.

Tabela 2. Coeficientes de fixação F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965), o valor do fluxo gênico (Nm) e teste χ^2 para avaliar o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg para plantas de duas populações de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*.

<i>Locus</i>	$F_{(IS)}$	$F_{(IT)}$	$F_{(ST)}$	Nm^*	Equilíbrio de Hardy-Weinberg**	
					<i>Conyza canadensis</i>	<i>Conyza bonariensis</i>
<i>Est-1</i>	0,4231	0,4394	0,0283	8,5949	19,7	100,59
<i>Est-2</i>	0,2634	0,2657	0,0031	79,8426	39,07	26,99
<i>Est-3</i>	-0,0475	-0,0471	0,0004	570,2336	0,238	1,676
<i>Est-4</i>	0,0501	0,0593	0,0097	25,4542	3,203	0,522
<i>Est-5</i>	-0,203	-0,1813	0,018	13,6048	1,571	4,621
<i>mbMDH</i>	0,3972	0,4032	0,0099	24,9544	20,469	34,21
<i>ACP-2</i>	0,2515	0,2784	0,036	6,6922	67,088	3,333

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

** Valor do χ^2 para avaliar o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$).

3. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO WEED RESEARCH

Weed Research

The Official Journal of the European Weed Research Society

Edited by:

E.J.P. Marshall

Print ISSN: 0043-1737

Online ISSN: 1365-3180

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 48 / 2008

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2006: 7/49 (Agronomy); 41/147 (Plant Sciences)

Impact Factor: 1.705

TopAuthor Guidelines

AuthorGuidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Relevant Documents: Exclusive Licence Form, Colour Work Agreement Form Useful

Websites: Submission Site, Articles published in Weed Research, Author Services, Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

1.GENERAL

Weed Research is an international peer-reviewed journal that publishes topical and innovative papers on weed science, in the English language. It is the official journal of the European Weed Research Society. Papers are taken on all aspects of weeds, defined as plants that impact adversely on economic, aesthetic or environmental aspects of any system. Topics include, amongst others, weed biology and control, herbicides, invasive plant species in all environments, population and spatial biology, modelling, genetics, biodiversity and parasitic plants. The journal welcomes submissions on work carried out in any part of the world. In addition to research papers, the journal also seeks review articles and shorter insights papers covering personal views, new methods and breaking news in weed science. The criteria Editors use for accepting manuscripts for publication are originality, relevance, scientific rigour and the clarity of

presentation. The journal accepts approximately 30% of submitted manuscripts and the time taken from submission to publication is 11.5 months.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Weed Research. Authors are encouraged to visit Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

The Weed Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship and, except in the case of complex large-scale or multi-centre research, the number of authors should not exceed six.

Weed Research adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under Acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate.

2.2. Ethical Approvals

Authors must confirm that all the research meets the ethical guidelines, including adherence to the legal requirements, of the study country.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations. Papers not in agreement with the guidelines of the Helsinki Declaration as revised in 1975 will not be accepted for publication.

2.3 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Conflict of Interest: Weed Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. As of 1st March 2007, this information will be a requirement for all manuscripts submitted to the Journal. Please include this information under the separate headings of "Source of Funding" and "Conflict of Interest" at the end of your manuscript.

If the author does not include a conflict of interest statement in the manuscript then the following statement will be included by default: "No conflicts of interest have been declared".

Source of Funding: Authors are required to specify the source of funding for their research when submitting a paper. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. The information will be disclosed in the published article.

2.5 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the Editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive licence to the European Weed Research Society if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes, in electronic databases and the like, or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to the European Weed Research Society. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Exclusive Licence Form must be sent to the address specified on the form, before any manuscript can be published. Authors must send the completed original Exclusive Licence Form by regular mail upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the form at submission. Faxing or e-mailing the form does not meet requirements.

For questions concerning copyright, please visit Blackwell Publishing's Copyright FAQ

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/wre>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper are available online and below. Further assistance can be obtained from Dr Jon Marshall at the Editorial Office of WRE (jon.marshall@agroecol.co.uk).

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/wre>
- Log-in or click the "Create Account" option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on "Create Account", enter your name and e-mail information and click "Next". Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click "Next."
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise.
 - Click "Finish".
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system (<http://mc.manuscriptcentral.com/wre>) and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select "Author Centre"

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the "Submit a Manuscript" link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the "Next" button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the "Browse" button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the "Upload Files" button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the "Submit" button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, summary, text, references, tables, and figure legends. Figures may be embedded at the end of the manuscript. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to Weed Research will be reviewed by two experts in the field. Weed Research uses single-blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper, unless the reviewers so wish.

Please upload:

- Your manuscript with title page under the file designation "main document"
- Figure files under the file designation "figures"
- The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation "title page"

All documents uploaded under the file designation "title page" will not be viewable in the HTML and PDF format you are asked to review at the end of the submission process. The files viewable in the HTML and PDF format are the files available to the reviewer in the review process.

3.5. Suggesting Reviewers

Weed Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, you may suggest the names and current e-mail addresses of up to 3 potential international reviewers (preferred) whom you

consider capable of reviewing your manuscript. You may also list the names and e-mail addresses of reviewers that you do not wish to review your manuscript (non-preferred).

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the "Submit" button and save it to submit later. The manuscript can then be located under "Unsubmitted Manuscripts" and you can click on "Continue Submission" to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by spam filtering software on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access Manuscript Central any time to check your "Author Centre" for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

Revised manuscripts must be uploaded within 3 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Locate your manuscript under "Manuscripts with Decisions" and click on "Submit a Revision" to submit your revised manuscript. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload your manuscript document separate from your title page.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: Original and innovative research papers relevant to weed biology, ecology and management are sought. There should be sufficient material presented so that the information is of wider interest than just for local conditions. Thus, single experiments are unlikely to be acceptable. Research should cover sufficient temporal and spatial variation to be able to make sound generalisations. For example, evaluation of herbicide efficacy should be over more than one year at more than one site or soil type. Original research papers should be no longer than 6000 words in total, including all tables, legends and references.

Review Articles: Review articles are encouraged. Reviews should critically evaluate the subject area and identify new conclusions and gaps in knowledge, rather than simply presenting summaries of previous work. Papers may be longer than research articles at the discretion of the editors.

Insights: The journal will accept short Insights articles covering personal views, new methods and breaking news in weed science. These articles may cover scientific opinions, new methods or proof-of-concepts, as well as important and topical pieces of research that require further validation. Key criteria are that the content is of wide interest to weed scientists, is novel and is likely to significantly advance weed science.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Abbreviations should be written in full at first mention. Spellings should conform to those used in the Concise Oxford Dictionary. SI units should be used throughout.

Scientific Names:

Weed names Scientific names should be used throughout the paper, either in italic or underlined. Attribution should be given at the first mention in the main text (not the title or summary). The English common name may also be given in parentheses after the first mention in the text. Thereafter the generic name of the weed may be abbreviated to its initial letter, e.g. *S. media*, provided that there is no possibility of confusion with another generic name. Note: broad-leaved weeds, not broad-leaf weeds; monocotyledons, not monocots.

Crop plant names The common name should be used throughout the paper, but the scientific name with attribution should be given in parentheses at the first mention in the main text (not the

title or summary), e.g. sunflower (*Helianthus annuus* L.). Note: maize, not corn; lucerne, not alfalfa; oilseed rape, not canola; soyabean, not soybean, Flax crops should be identified as either fibre flax or linseed flax. Published growth stage keys may be used with the appropriate reference.

Herbicides, desiccants and growth regulators Use the common name if one has been approved by BSI, WSSA or ISO, as listed in Weed Abstracts . Otherwise give the full chemical name (IUPAC nomenclature) at the first mention in the title or the abstract and again in Materials and methods , where it should be accompanied by a code number. Thereafter use only the code number. For each chemical (e.g. pendimethalin), the product name (Stomp 400 SC) formulation used (SC), its concentration (400 g a.i. L⁻¹ and the supplier (BASF plc) should be stated in Materials and methods, e.g. pendimethalin (Stomp 400 SC, 400 g a.i. L⁻¹, SC, BASF plc) Trade names should not be used elsewhere in the paper.

Application Details should be presented in Materials and methods of spray volume (in L ha⁻¹), nozzle type and size, and spray pressure (in kPa). Doses of herbicides and other chemicals should be expressed throughout the paper in terms of active ingredient, g a.i. ha⁻¹, not as weight or volume of product. This applies also to cited references.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to Weed Research should include: Title, Keywords, Summary, Main Text (divided by appropriate sub headings) and References.

Title Page: This should give the title of the article, the names and initials of each author, the department and institution to which the work should be attributed, the name, address, international telephone and fax numbers and e-mail address of the author for correspondence, proofs and free copies, and a short title of 40 characters or less if the paper title exceeds this limit. Up to two lines of keywords (not key phrases) should be listed below the summary. Please include a total word count.

Summary: the summary should be on a separate page and should not exceed 200 words. Complete the summary with a clear presentation of the implications of the work for scientific theory and practical weed management. Avoid statements such as "the results are discussed".

Optimising Your Abstract for Search Engines

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimising your article for search engines, you will increase the

chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximise the web-friendliness of the most public part of your article.

Main Text of Original Research Article This should begin on a separate page, and include an introduction, materials and methods, results and discussion. Research papers should be no longer than 6000 words in total, including all tables, legends and references.

Introduction: Place the work in context and clearly state the questions addressed within the paper, preferably expressed as hypotheses to be tested.

Material and Methods: the Materials and methods section should include full details of the statistical techniques used and authors are advised to refer to the article 'Guidance for the use and presentation of statistics' in Weed Research (1988) 28, 139-144. This guide is to be updated shortly. Preference is given to the presentation of standard errors of differences between means with appropriate degrees of freedom, rather than least significant differences in tables. Standard errors, etc., should be given to one more decimal place than the means to which they apply. Please do not use multiple range tests.

Results: Results should be separated from discussion. Present the key analysed results objectively. Do not repeat data in both tables and figures.

Discussion: Discuss the implications of the results in the context of previous research. Critically evaluate the methods employed.

Conclusion: This section is optional.

Main Text of Review Article This should follow the structure of an Original Article, unless other sub-headings are more appropriate. Papers may be longer than research articles at the discretion of the editors

Main Text of Insights Insights papers should be no more than 2000 words in total, have a flexible format, but must have a Summary. They may also follow the separate sections of Introduction, Methods, Results, Discussion and References at the discretion of editors.

Acknowledgements: Please see above under Authorship and Ethical Guidelines.

5.3. References

The Journal follows the Harvard reference style. In the text, cite authors' names followed by the date of publication e.g. in the text Author and Author (1994) or in parentheses (Author e Author, 1994). Where there are three or more authors, the first author's name followed by et al. will

suffice. Where more than one reference is cited they should be listed in chronological order. References to unpublished work should be cited only in the text as 'A. Author pers. comm.' or 'A. Author unpubl. obs.'. Reference lists should be ordered alphabetically. Journal titles should be quoted in full. 'In press' is only acceptable if a volume number can be quoted.

Examples

AUTHOR AB e AUTHOR BC (1989) Title of article. *Journal Title in Italics in Full* 00, 123-129.

AUTHOR A, AUTHOR B, AUTHOR C et al. [if more than 6] (1994) Book Title (ed. A B Editor). Publisher, Place, Country.

AUTHOR A e AUTHOR B, Jr (1989) Chapter title. In: *Book Title in Italics*, Vol. 1. Upper-case Initials to Nouns etc. (eds AB Editor e CD Editor), 2nd edn, 21-34. Publisher, Place, Country.

AUTHOR A (1989) Paper title with lower-case initials to all words. PhD thesis, University, Town, Country.

AUTHOR A (1992) Title of article. In: *Proceedings 1991 Title of Conference*, Location, Country, 158-165.

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see www.doi.org/ for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp

Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should only be used to clarify important points. Tables must, as far as possible, be self-explanatory. The tables should be numbered consecutively with Arabic numerals.

Figures: All graphs, drawings and photographs are considered figures and should be numbered in sequence with Arabic numerals in order of appearance.

Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Blackwell Publishing's guidelines for figures:

www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp

Check your electronic artwork before submitting it:

www.blackwellpublishing.com/bauthor/eachecklist.asp

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

Colour Charges: It is the policy of Weed Research for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a Colour Work Agreement Form before your paper can be published. Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor (wre@oxon.blackwellpublishing.com)

Figure Legends: Each figure should have a legend and all legends should be typed together on a separate sheet and numbered correspondingly.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Proofs must be returned to the Author Corrections Team within three days of receipt. Please note that if you have registered for production tracking e-mail alerts in Author Services, there will be no e-mail for the proof corrections received stage. This will not affect e-mails alerts for any later production stages.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

6.2 Author Services

Online production tracking is available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on

online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

For more substantial information on the services provided for authors, please see Blackwell Publishing Author Services

6.3 Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.4 Offprints and Extra Copies

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields:
offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bweFID=USER_HOME_PG

If you have queries about offprints please e-mail offprint@cosprinters.com