

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

MAYCON RODRIGO RUIZ BEVILAQUA

Avaliação do perfil genético de regiões de microssatélites em amostras de
Conyza spp.

Maringá
2015

MAYCON RODRIGO RUIZ BEVILAQUA

Avaliação do perfil genético de regiões de microssatélites em amostras de
Conyza spp.

Tese 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 Doutor em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Profa. Dra. Claudete Aparecida Mangolim
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado

Maringá
2015

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

B571a Bevilaque, Maycon Rodrigo Ruiz
Avaliação do perfil genético de regiões de
microssatélites em amostras de *Conyza spp.* / Maycon
Rodrigo Ruiz Bevilaque -- Maringá, 2015.
80 f. : il., color., figs., tabs., maps.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudete Aparecida Mangolim.
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva
Machado.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá,
Centro de Ciência Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Comparada, 2015.

1. Diversidade genética. 2. Plantas daninhas. 3.
Marcadores moleculares. 4. *Conyza canadensis*. 5. *Conyza*
bonariensis. 6. *Conyza sumatrensis*. I. Mangolim, Claudete
Aparecida, orient. II. Machado, Maria de Fátima Pires da
Silva, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Comparada. IV. Título.

CDD 21.ed. 576.58
AHS-002838

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAYCON RODRIGO RUIZ BEVILAQUA

Avaliação do perfil genético de regiões de microssatélites em amostras de
Conyza spp.

Tese 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 Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

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

Profa. Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Sandra Aparecida Oliveira Collet
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Fernando Storniolo Adegas
Embrapa Soja – Londrina-PR.

Prof. Dr. Antonio Luiz Cerdeira
Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto
Ambiental – Jaguariuna-SP.

Aprovada em: 29 de junho de 2015.

Local de defesa: Sala 15, Bloco H78, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a
todos os meus
professores.

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo:

Primeiramente a Deus, fonte de onde tiro a minha força e alegria;

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada (PGB) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade da realização deste trabalho;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - pela bolsa de estudo concedida;

Em especial a professora Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin, pela orientação neste trabalho, por sua dedicação, competência e pelos conhecimentos transmitidos a mim. E a professora Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado pela coorientação, por sua atenção e dedicação na realização do trabalho;

Aos demais professores do laboratório Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal e Genética Animal, Prof^a Dr^a Sandra Aparecida de Oliveira Collet e Prof^a Dr^a Maria Claudia Colla Ruvulo Takasusuki por toda sua dedicação a cada um de nós alunos do laboratório;

Aos professores do programa de pós-graduação, pelo apoio durante essa etapa da minha vida, em especial às Prof^a. Dr^a. Carmem Lucia Rocha e Prof^a. Dr^a Rosilaine Carrenho por seus trabalhos na coordenação do curso;

Ao professor Dr. Rubem Silvério de Oliveira Jr. e aos membros do Núcleo de Estudos Avançados em Ciências das Plantas Daninhas (NAPD), pelo fornecimento do material e apoio na parte inicial deste trabalho;

A todos os meus familiares, meus pais Valter Bevilaqua e Aparecida de Fátima Ruiz Bevilaqua, meu irmão Luis Antonio Ruiz Bevilaqua e minha cunhada Juliana Cavasin Bevilaqua, minha avó Rosa Olher Bevilaqua, por todo apoio, confiança, motivação e orações;

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal, especialmente à Andrea, Danuza, Liriana, Vanessa, Katilin, Juliana, Gilberto, Raphael, Tauna pelo companheirismo, apoio, incentivo e por proporcionar momentos de diversão em meio a tanto trabalho, tornando essa caminhada mais suave. E aos meus amigos fora âmbito acadêmico, obrigado por fazer parte de minha caminhada;

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais, Sérgio e Leila por toda ajuda prestada durante o desenvolvimento desse trabalho e aos demais funcionários do departamento de Biotecnologia, Biologia Celular e Genética;

As secretárias do curso de pós-graduação, inicialmente Márcia Helena Leonel e nos dois últimos anos Maria Estela Afonso por sua paciência e competência na secretaria do curso;

Ao “Centre for Research in Agricultural Genomics” (CRAG) – Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) por me receber para o meu Doutorado Sanduiche e ao professor Dr Jaume Martínez por me acolher em seu laboratório e me transmitir o conhecimento das diferentes técnicas de biotecnologia, que me permitiram desenvolver o trabalho utilizado para a minha qualificação. E aos amigos que lá fiz e me ajudaram nessa tarefa, em especial Alex, Aline, Andreia, Angelo e Natália.

Avaliação do perfil genético de regiões de microssatélites em amostras de *Conyza* spp.

RESUMO

O gênero *Conyza* possui aproximadamente 50 espécies distribuídas por quase todo o mundo. Neste gênero podem ser destacadas algumas espécies por infestarem áreas agrícolas, podendo causar graves perdas econômicas para a agricultura. No presente estudo, locos de microssatélites (Simples sequências repetidas - SSR) foram utilizados para investigar a divergência genética e a estrutura de populações entre populações de *Conyza* spp coletadas em cinquenta diferentes regiões do Brasil: Rio Grande do Sul (três), Santa Catarina (seis), Paraná (trinta e cinco), São Paulo (dois) e Mato Grosso do Sul (três). Os *primers* selecionados para o estudo foram: HW02, HW04, HW06, HW21, HW27, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR09. A análise de dez microssatélites foi realizada em 10 plantas de cada um dos diferentes locais, totalizando 500 amostras de *Conyza* spp. Esta análise resultou na amplificação de 42 alelos, com uma média de 4,2 alelos polimórficos por loco. O *Primer* HWSSR01 teve o maior número de alelos (6). Cinco alelos foram identificados utilizando os *primers* HW02, HW21 e HW27; quatro alelos utilizando os *primers* HW04, HW06, HWSSR03 e HWSSR04; três alelos com *primers* HWSSR09. O *primer* HW29 teve o menor número de alelos (2). O polimorfismo entre as 50 populações analisadas variou de 30% a 100%. A heterozigosidade média esperada estimada pelo índice de Nei foi de 0,6287, e a heterozigosidade média observada (H_e) foi de 0,2222, portanto, houve uma grande diminuição de locos com fenótipos heterozigotos. O microssatélite HW29 apresentou excesso de heterozigotos (FIS -0,8954). A análise da diversidade genética entre as populações mostrou-se muito elevada, com índice F_{st} de 0,4208, indicando que existe um elevado grau de diferenciação entre as populações estudadas. Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) mostraram que a diversidade genética dentro das populações é mais elevada (54%) do que entre as populações (46%). A maior parte das populações foi altamente diferenciada conforme o esperado para espécies que apresentam autopolinização. Além disso, para as espécies invasoras que crescem sobre forte pressão de seleção por aplicação constante de herbicida, espera-se que se apresentem altamente diferenciadas. A menor similaridade genética (0,1644) foi observada entre as populações de São José do Ouro-RS e Maringá-PR, a maior similaridade genética foi 0,9174, e foi observada entre as populações de Palotina-PR e Mamborê-PR. O teste de Mantel mostrou uma correlação de $R^2 = 0,1032$, indicando que a diversidade genética não está correlacionado com a distância geográfica. A análise das 50 populações de *Conyza* spp. de acordo com o modelo de estatística Bayesiana, indicou que as 500 plantas foram agrupadas em 11 subpopulações ($\Delta K_{11} = 8,362483$), é possível observar que nos diferentes estados, bem como em diferentes áreas de um mesmo estado (PR), ocorre uma seleção diferencial de genótipos de *Conyza* spp. e estes foram organizados em onze grupos ancestrais diferentes.

Palavras-chave: Diversidade genética, Plantas daninhas, Marcadores moleculares, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*, *Conyza sumatrensis*

Genetic profile in microsatellite regions of samples *Conyza* spp.

ABSTRACT

Conyza genus has about 50 species distributed almost worldwide. In this genus can be highlighted some species infest agricultural areas, potentially causing serious economic losses in agriculture. In the current study, microsatellite loci (Simple sequences repetitive SSR) were used to investigate the molecular divergence genetics and structure of populations of *Conyza* spp collected in fifty different regions of Brazil: Rio Grande do Sul state three, Santa Catarina state six, Paraná state thirty five, São Paulo state two and Mato Grosso do Sul three. Primers selected for the study were: HW02, HW04, HW06, HW21, HW27, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR09. The analysis of ten microsatellite loci was performed on 10 plants each of the different locations, totaling 500 samples *Conyza* spp. This analysis resulted in the amplification of 42 alleles, with an average of 4.2 polymorphic alleles per locus. Primer HWSSR01 had the highest number of alleles (6). Five alleles were identified using the primers HW02, HW21 and HW27; four alleles using primers HW04, HW06, HWSSR03 and HWSSR04; three alleles with primer HWSSR09. The HW29 primer had the lowest number of alleles (2). Polymorphism among the 50 studied populations ranged from 30% to 100%. The average expected heterozygosity estimated by Nei index was 0.6287, and average observed heterozygosity (H_e) was 0.2222, so there, was a large decrease of loci with phenotypes heterozygous. The HW29 microsatellite presented excess of heterozygotes ($F_{is} = -0.8954$). Analysis of genetic diversity amongst populations proved to be very high with index $F_{st} = 0.4208$, indicating that there is a high degree of differentiation among the populations studied. The results of the analysis molecular variance (AMOVA) showed that the genetic diversity within populations is higher (54%) than among populations (46%). Most populations were highly differentiated as expected for selfing species. Moreover, invasive species that are developed under strong selection pressure by herbicide application are expected to show high genetic differentiation. The smallest genetic similarity (0.1644) was observed between populations of São José do Ouro-RS and Maringá-PR, the largest genetic similarity was 0.9174, among populations Palotina-PR and Mamborê-PR. Mantel test showed a correlation of $R^2 = 0.1032$ indicating that genetic diversity is not correlated with the geographic distance. The analysis of 50 populations of spp. according to the model of the statistics Bayesian, indicated that 500 plant were grouped into 11 subpopulations ($\Delta K_{11} = 8.362483$), it is possible that in different states as well as in different areas of the same state (PR), there is a differential selection of genotypes of *Conyza* spp. there is a differential selection of genotypes of *Conyza* spp. and these were organized in eleven different ancestral groups.

Keywords: Genetic Diversity, Weed, Molecular Markers, *Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*, *Conyza sumatrensis*

SUMÁRIO

Capítulo 1	10
1- Introdução	11
2- Revisão Bibliográfica	13
2.1- Plantas Daninhas e seu controle	13
2.2- Família Asteracea	15
2.2.1- O gênero <i>Conyza</i>	15
2.2.2- <i>Conyza canadensis</i>	16
2.2.3- <i>Conyza bonariensis</i>	17
2.2.4- <i>Conyza sumatrensis</i>	18
2.3- Interferência das plantas daninhas nas culturas	18
2.4- Resistência a herbicidas	19
2.5- Diversidade Genética em Plantas Daninhas	22
2.6- Marcadores Moleculares	23
3- Referências	26
 Capítulo 2	 33
Anexos	66

CAPÍTULO 1

1 – Introdução;

2 – Revisão Bibliográfica;

1. Introdução

A família Asteraceae possui cerca de 1600 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, representando cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1994). No Brasil, a família é representada por, aproximadamente, 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetais (BARROSO et al., 1991; NAKAJIMA e SEMIR, 2001).

Pertencente a essa família, o gênero *Conyza* possui aproximadamente 50 espécies e estas se encontram distribuídas por quase todo o mundo (KISSMANN e GROTH, 1999). Dentro deste gênero as espécies mais importantes são as espécies *C. canadenses*, *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*, conhecidas popularmente por “buva”, destacam-se por infestarem áreas abandonadas (constituídas por terrenos baldios e margens de estradas), pastagens, culturas perenes (citros e café) e lavouras anuais (algodão, milho, soja e trigo) (THEBAUD e ABBOTT, 1995). No mundo todo, estas espécies de daninhas infestam mais de 40 culturas (HOLM et al., 1997).

O grau de interferência das plantas daninhas nas culturas depende da comunidade vegetal infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivar, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do período de convivência. Essa competição impede o desenvolvimento normal das plantas, promove decréscimo na qualidade do produto colhido, como também provoca dificuldades durante a realização da colheita (PITELLI, 1985; LORENZI, 2000).

O gênero *Conyza* é evidentemente, propenso para selecionar genótipos que apresentam resistência ao glifosato. Nesse gênero verifica-se a resistência para os inibidores do fotossistema II, bipiridílios (paraquat), uréias, amidas, e os inibidores da ALS e glifosato (HEAP, 2015). A grande produção de sementes (cerca de 150 mil por planta), e a rápida dispersão destas pelo vento facilitam a rápida disseminação de resistência de *Conyza* ao longo das paisagens agrícolas do mundo (BUHLER e OWEN, 1997; WEAVER, 2001; DAUER e MORTENSEN 2005). Biotipos das três espécies de *Conyza*, também já foram relatados como resistentes ao glifosato no Brasil (CHRISTOFFOLETI et al., 2006; MONTEZUMA et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; VARGAS et al., 2007, SANTOS et al., 2014).

Os microssatélites (Simple Sequências Repetidas – SSR) têm sido usados como marcadores moleculares para avaliar polimorfismos de DNA, em estudos com diferentes finalidades, e em diversas espécies de plantas (DEMORE, 2008; CARVALHO, 2007) incluindo espécies de plantas daninhas (GOULART et al., 2011). De maneira geral, os

microssatélites são considerados como os marcadores moleculares mais informativos para estudos de genética em nível de espécies, porque são marcadores codominantes e multialélicos, de alto polimorfismo, apresentando maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as outras classes de marcadores moleculares (GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1998).

Pesquisas feitas com o gênero *Conyza* foram realizadas recentemente por Okada et al. (2013) com a espécie *C. canadensis* para obtenção de informações sobre a evolução, a origem e a propagação da resistência. Nesse estudo foi investigada a distribuição geográfica da resistência ao glifosato em *C. canadensis* no Vale Central da Califórnia, CA, USA, também foi avaliada a diversidade genética e a estrutura de populações utilizando os marcadores microssatélites desenvolvidos por esse grupo de trabalho. Análises da estrutura genética populacional revelaram várias origens independentes para a resistência dentro do Vale Central da Califórnia.

Okada et al. (2015) usaram os mesmos marcadores microssatélites para elucidar as origens evolutivas e a disseminação espacial da resistência, ao glifosato em *C. bonariensis* no Vale Central da Califórnia, CA, USA. Nesse estudo foram analisadas trinta e cinco populações coletadas em pomares e parreirais de todo o Vale Central. Os resultados indicaram que a baixa taxa de autopolinização em *C. bonariensis*, o que segundo os autores pode explicar o aumento substancial da diversidade genética dessa espécie quando comparada com *C. canadensis*, e essa maior diversidade genética propicia um maior potencial para a evolução de biotipos resistentes em períodos de tempo mais curtos.

O aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas pode estar condicionado também a mudanças genéticas nas populações, impostas pela pressão de seleção, causada pela repetitiva aplicação dos herbicidas. A proposta do presente estudo foi avaliar o perfil genético de regiões de microssatélites em populações de *Conyza* spp. coletadas de 50 diferentes localidades nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, e em função da análise da diversidade genética verificar como estas populações se encontram geneticamente estruturadas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Plantas Daninhas e seu controle

Planta daninha é qualquer espécie vegetal, que cresça espontaneamente e que, de alguma forma, interfere negativamente em alguma atividade humana e cause prejuízos a essa atividade (CARVALHO, 2013; FONTES et al., 2003). Portanto, todos os conceitos baseiam-se na sua indesejabilidade em relação a uma atividade humana. Uma planta pode ser daninha em determinado momento se estiver interferindo negativamente nos objetivos do homem, porém esta mesma planta pode ser útil em outra situação ou cenário biológico (SILVA et al., 2006).

Para Silva et al. (2006) e Carvalho (2013) o estudo das plantas daninhas é uma ciência multidisciplinar que depende de conhecimentos de botânica, biologia, mecanização agrícola, física e química do solo, química orgânica, bioquímica, fisiologia vegetal, climatologia, fitotecnia, técnicas de biologia molecular e sensoriamento remoto. Estes mesmos autores ressaltaram também, que como toda ciência, o estudo das plantas daninhas é dinâmico e novas técnicas estão sempre sendo pesquisadas e incorporadas, como as técnicas de biologia molecular (biotecnologia) e o sensoriamento remoto, que tem sido úteis na identificação de plantas daninhas.

Com o desenvolvimento da sociedade humana, ocorreu não só a continuidade como a expansão geográfica das áreas de agricultura e pecuária, o que permitiu a evolução das plantas pioneiras e o aparecimento de novas espécies. Assim, as comunidades infestantes foram se tornando cada vez mais densas, diversificadas e especializadas na ocupação dos agroecossistemas, passando a interferir profundamente nas atividades agrícolas. Esse tipo de vegetação passou a ser alvo de controle (GALLI e MONTEZUMA, 2005).

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

Na primeira metade do século 20, a mecanização agrícola foi a grande arma para o controle das plantas daninhas, devido à força e à diversidade dos equipamentos de preparo do solo, os quais eram eficientes nas mais diversas situações da agricultura mundial. No final do século XIX, iniciaram-se as primeiras pesquisas com controle químico de plantas daninhas, utilizando sais de cobre para o controle de algumas eudicotiledôneas. No início do século XX, o sulfato ferroso foi testado para o controle dessas plantas em trigo, mas foi apenas durante a Segunda Guerra Mundial que cresceu o interesse em produzir herbicidas, principalmente para desfolhar florestas. Por volta de 1942, foi descoberto o 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), dando início à produção de herbicidas em escala comercial. A partir de 1950, surgiram herbicidas dos grupos amidas, carbamatos, triazinas etc. Com o desenvolvimento de novos produtos e com a adoção do controle químico como o principal método de controle de plantas daninhas. Hoje, quase 50% dos defensivos agrícolas comercializados são herbicidas (CARVALHO, 2013).

Segundo Silva et al. (2006), a dificuldade de se encontrar mão-de-obra no campo, no momento preciso e na quantidade necessária, além da eficiência e, principalmente, a economia do controle químico, tornou o uso de herbicidas uma prática indispensável, sendo necessários, entretanto, cuidados técnicos para atingir a máxima eficiência com o mínimo impacto negativo ao solo, à água e aos organismos que não são alvos.

A evolução dos implementos de cultivo do solo, preparo do solo e controle de plantas daninhas também permitiu a evolução das plantas daninhas, sempre pensando no fator de pressão de seleção. Nesse sentido, com advento do arado e outros implementos de cultivo do solo, sementes de algumas espécies de plantas daninhas eram enterradas devido à inversão do solo. Assim, espécies de plantas que germinavam e emergiam em grandes profundidades passaram a se adaptar a essas áreas. Mais recentemente, com o advento do plantio direto, sem revolvimento do solo, observou-se uma mudança na flora de plantas daninhas. Essa mudança deve-se à alteração na intensidade de estresse e distúrbio em comparação ao plantio convencional. Nos últimos anos, o principal fator de seleção tem sido os herbicidas. A alta pressão de seleção exercida por esses produtos, aliada ao seu uso inadequado, tem contribuído com a seleção de biótipos resistentes, tornando-se, talvez, o principal problema atual relacionado ao manejo de plantas daninhas (CARVALHO, 2013).

Para Galli e Montezuma (2005), toda e qualquer técnica de manejo de plantas daninhas somente terá sucesso se for aplicada levando-se em conta conhecimentos detalhados da biologia das plantas infestantes da área, envolvendo principalmente conhecimentos nas áreas de morfologia e fisiologia.

2.2 Família Asteracea

A família Asteraceae possui cerca de 1600 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, representando cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1994). No Brasil, a família é representada por, aproximadamente, 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetais (BARROSO et al., 1991; NAKAJIMA e SEMIR, 2001). Várias características morfológicas em Asteraceae suportam seu monofiletismo, entre elas a presença de um capítulo altamente modificado, ovário bicarpelar ínfero que se desenvolve em uma cipsela com óvulo basal e reto e anteras sinânteras (JANSEN e PALMER, 1988).

Constituída de ervas perene, subarbustos, e arbustos, mas ocorrem também ervas anuais, lianas e árvores. Devido ao seu extraordinário poder de adaptação ambiental, as Asteraceae apresentam distribuição cosmopolita, encontrando-se disseminadas por todos os continentes, com exceção da Antártida, porém com representação mais ampla nas regiões temperadas e semi-áridas dos trópicos e subtropicos (MONDIN, 2006).

Seu sucesso biológico e evolutivo por ser atribuído em partes: primeiro por sua grande capacidade de produção e dispersão de sementes, devido à presença de sementes com pápus plumosos, apêndices e estruturas de aderência; segundo o desenvolvimento de um sistema químico de defesa que inclui a produção combinada de compostos secundários muitos derivados, do tipo poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas. (VENABLE e LEVIN, 1983; ROQUE E BAUTISTA, 2008).

2.2.1 O Gênero *Conyza*

O gênero *Conyza* possui aproximadamente 50 espécies e estas se encontram distribuídas por quase todo o mundo (KISSMANN e GROTH, 1999). Dentro deste gênero as espécies mais importantes são *C. canadenses*, *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*, conhecidas popularmente por “buvas”, destacam-se por infestarem áreas abandonadas (constituídas por terrenos baldios e margens de estradas - Figura 1a, Figura 1d, Figura 1e, Figura 1f), pastagens, culturas perenes (citros e café – Figura 1b) e lavouras anuais (algodão, milho, soja e trigo – Figura 1c) (THEBAUD e ABBOTT, 1995). No mundo todo, estas espécies de daninhas infestam mais de 40 culturas (HOLM et al., 1997).

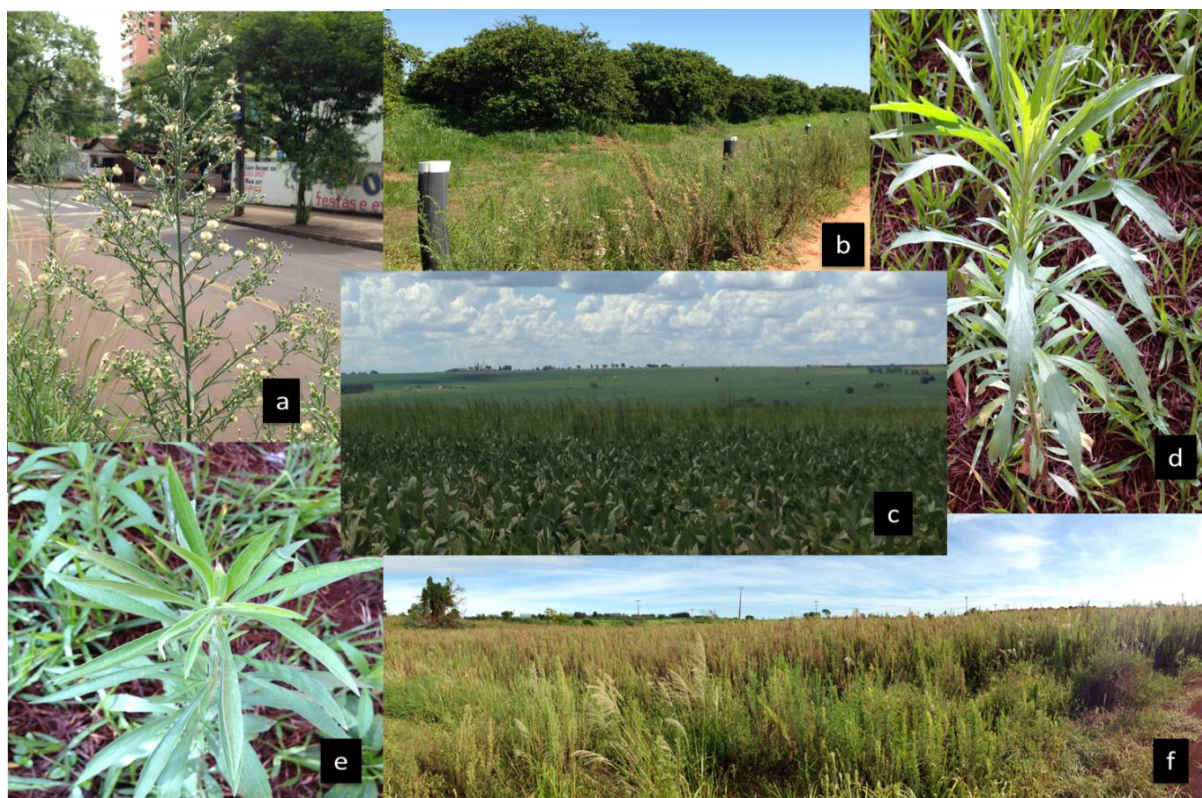


Figura 01: **a)** *Conyza* spp em área urbana – Zona 07 – Maringá-PR. **b)** Infestação em área de Citrus – Município de Castelo Branco-PR. **c)** *Conyza* spp em plantação de soja. – Município de Floresta-PR. **d)** e **e)** *Conyza* spp no campus da Universidade Estadual de Maringá. **f)** Área rural no município de Mandaguari-PR totalmente infestada por buva.

2.2.2 *Conyza canadensis*

Conyza canadensis (L.) é nativa da América do Norte (NOYES, 2000), está presente em quase todas as regiões do Canadá (ROULEAU e LAMOUREUX, 1992), Estados Unidos (USDA, 1970), oeste da Europa e Planície Mediterrânea (THEBAUD e ABBOTT, 1995), Austrália e Japão (HOLM et al., 1997). Também é frequente em regiões subtropicais do hemisfério sul, mas é pouco frequente em regiões tropicais (KISSMANN e GROTH, 1999).

Trata-se de uma espécie diploide, com um número cromossômico de $2n = 18$ (THEBAUD e ABBOTT, 1995). *C. canadensis* possui ciclo anual, ocorrendo no inverno e no verão, infestando mais de 40 tipos de culturas diferentes; são encontradas em pomares, vinhedos, campos agrícolas, pastagens, estradas e margens de canais (WEAVER, 2001). A germinação ocorre no outono, e forma uma roseta basal para sobreviver durante o inverno. Embora tenha a capacidade de germinar durante todo o ano a pequena fração da população que emerge na primavera produz sementes, mas as plantas morrem no verão (REGEHR e BAZZAZ, 1979, HOLM et al., 1997, WEAVER, 2001). É uma espécie autógama, com estimativas que variam de 85-99% de autofecundação em ambientes naturais, dependendo da

altura da planta e proximidade com a planta vizinha, e se reproduz apenas por sementes (WEAVER, 2001). Cada planta é capaz de produzir mais de 200.000 sementes que podem se dispersar pelo vento ou pela água (DAVIS et al., 2009), sendo que regularmente a sua dispersão pode atingir de 100 a 500 metros da planta de origem (DAUER et al., 2007).

Segundo Vangessel (2001), essa foi a primeira espécie de folha larga anual a apresentar resistência ao glifosato. A resistência foi descrita em sistemas de cultivo de soja em Delaware (EUA). Atualmente, considera-se que *C. canadensis* esteja entre as dez mais importantes plantas daninhas resistentes a herbicidas, esta espécie evoluiu aos mecanismos de ação dos herbicidas inibidores fotossistema I e II, inibidores da síntese da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), apresentando relatos de múltipla resistência (POWLES e YU, 2010; HEAP, 2015). A espécie *C. canadensis* tem sessenta relatos de resistência a diferentes herbicidas, sendo trinta e seis nos Estados Unidos, três no Canadá e Polônia, dois na Bélgica, República Checa, França, Japão e Espanha, e o um relato no Brasil, China, Grécia, Israel, Itália, Portugal, Suíça e Reino Unido (HEAP, 2015).

2.2.3 *Conyza bonariensis*

A espécie *C. bonariensis* é nativa da América do Sul e ocorre de forma abundante na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. Ela também está presente na Colômbia e na Venezuela, onde infesta lavoura de café. No Brasil, sua presença é mais intensa nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (KISSMANN e GROTH, 1999, VARGAS, et al., 2007).

A espécie *C. bonariensis* foi descrita como sendo hexaploide, com o número de cromossomos $2n = 54$ (GOLDBLATT, 1985). O número médio de sementes por capítulo é de 190 e 550 sementes, com média de 400 sementes (WU e WALKER, 2004) e a sua propagação ocorre somente via semente.

A temperatura ótima para a germinação das sementes é 20° C, com emergência de plântulas no início do outono e no início da primavera (ROLLIN e TAN, 2004). O ciclo de vida de *C. bonariensis* se completa na primavera ou no verão. Em relação ao porte da planta, esta foi descrita como apresentando altura do caule variando entre 40 e 60 cm de altura, podem apresentar ramificação no caule onde os ramos laterais ultrapassam o ramo central (WALKER et al., 2004).

Como a *C. canadensis*, a espécie *C. bonariensis* se destaca por infestar áreas abandonadas como terrenos baldios e margens de estradas, pastagens, culturas perenes, citros, café e lavouras anuais como algodão, milho, soja, e trigo (THEBAUD e ABBOTT, 1995). Em

termos mundiais, os relatos são de que esta espécie de daninha infesta mais de 40 culturas. No Brasil apresenta-se como importante planta daninha infestante de lavouras de trigo, soja e milho (HOLM et al., 1997).

C. bonariensis apresenta biotipos com resistência a quatro mecanismos de ação a herbicidas diferentes: inibidores do fotossistema I e II, inibidores da enzima ALS e inibidores da EPSPS, com relatos de casos de múltipla resistência. Essa espécie apresenta dezoito relatos de resistência, sendo três Austrália e Israel, dois na África do Sul, Estados Unidos e Espanha e um caso no Brasil, Colômbia, Egito, Grécia, Israel, Japão e Portugal (HEAP, 2015).

2.2.4 *Conyza sumatrensis*

Conyza sumatrensis é considerada uma espécie nativa da América do Sul, mas que se espalhou por todas as áreas tropicais e subtropicais em todos os continentes (THEBAUD e ABBOTT, 1995; PRUSKI e SANCHO 2006). Essa espécie é descrita como uma planta herbácea com ciclo anual ou bianual. Descrita com hexaplóide, com o número de cromossomos $2n=54$. Se reproduzem apenas por sementes, principalmente de autopolinização (GOLDBLATT, 1985; THEBAUD et al., 1996; CASE e CRAWLEY, 2000).

Como ocorre com as espécies de *C. canadensis* e *C. bonariensis* a *C. sumatrensis* torna-se invasiva de áreas abandonadas, pastagens, culturas perenes, citros, café e lavouras anuais de algodão, milho, soja, trigo em especial nas zonas subtropicais e temperadas (THEBAUD et al., 1996; CASE e CRAWLEY, 2000; DING et al., 2008). A *C. sumatrensis* apresenta biotipos com resistência a mecanismos de ação diferentes: inibidores da enzima ALS, inibidores da EPSPS e inibidores do fotossistema I, com casos de múltipla resistência, apresentando relato de resistência no Brasil, França, Grécia, Japão, Malásia, Espanha, Siri Lanka, Taiwan (SANTOS et al, 2014; HEAP 2015).

2.3 Interferências das plantas daninhas nas culturas

A interferência das plantas daninhas em culturas pode ocorrer de duas maneiras distintas: competição e alelopatia. As plantas competem com outras por recursos necessários ao crescimento, porém presentes em quantidades insuficientes no ambiente para atender as suas exigências. Os principais recursos para o crescimento são água, nutriente e luz. Como as plantas cultivadas têm menor capacidade de competição, em razão do processo de melhoramento pelo qual passaram, do que as plantas daninhas, elas sofrem mais os efeitos da

competição (FONTES, 2003). De acordo com Ferreira et al. (2000), competição por recursos é diferente de alelopatia. Para este autor, alelopatia seria qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente.

O grau de interferência das plantas daninhas nas culturas depende da comunidade vegetal infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivar, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do período de convivência. Essa competição impede o desenvolvimento normal das plantas, promove decréscimo na qualidade do produto colhido, como também provocar dificuldades durante a realização da colheita (PITELLI, 1985; LORENZI, 2000).

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

Quando *C. canadensis* está em uma densidade de 211 plantas m², tem mostrado uma redução de 71% no rendimento e na produção de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (BRUCE e KELLS, 1990). Trezzi et al. (2013) verificaram em seu trabalho um redução média na produtividade de 25%. Este fato foi verificado quando estes autores analisaram sete diferentes cultivares de soja, cultivadas na presença de *C. bonariensis*.

Segundo Trezzi et al. (2014) o maior impacto no rendimento de grãos de soja foi observado quando a planta daninha foi introduzida entre 18 e 38 dias antes da semeadura da soja. A perda de rendimento de soja foi proporcional à densidade de *C. bonariensis*. O número de vagens por planta é o componente de produção de soja mais afetado pela interferência das plantas daninhas.

2.4 Resistência a herbicidas

A Weed Science Society of America (WSSA) definiu resistência de plantas daninhas a herbicidas como “a habilidade de uma planta sobreviver e reproduzir-se, após exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para o biotipo selvagem da planta” (WEED SCIENCE, 2015).

Kissmann (2003) salienta que a sensibilidade natural de espécies de plantas a um herbicida é variável e por isso existem herbicidas seletivos para determinadas culturas, mas efetivos para a eliminação de certas espécies de plantas daninhas. Este autor ressalta que convencionou-se designar esses aspectos como tolerância e suscetibilidade, reservando-se o termo resistência para biótipos resistentes dentro de uma população de biótipos suscetíveis, da mesma espécie.

O gênero *Conyza* (Asteraceae) é, evidentemente, propenso para selecionar genótipos que apresentam resistência ao glifosato. Este gênero evoluiu resistência para os inibidores dos fotossistemas I e II, bipiridílios (paraquat), uréias, amidas, inibidores da ALS, inibidores da EPSPS (glifosato) (HEAP, 2015). A grande produção de sementes (cerca de 150 mil), e a rápida dispersão destas pelo vento facilitam a rápida disseminação de resistência de *Conyza* ao longo das paisagens agrícolas do mundo (BUHLER e OWEN, 1997; WEAVER, 2001; DAUER e MORTENSEN 2005). Biotipos das três espécies de *Conyza*, de ocorrências no Brasil também já foram relatados como resistentes ao glifosato (CHRISTOFFOLETI et al., 2006; MONTEZUMA et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; VARGAS et al., 2007, SANTOS et al., 2014).

O glifosato pertence ao grupo de produtos químicos inibidores da síntese de aminoácidos e contém N-(Fosfonometil) glicina como ingrediente ativo (BRIDGES, 2003). Depois de ser absorvido pelas plantas, ele é prontamente translocado, juntamente com os fotossintetizados, do ponto de aplicação que são as folhas para os drenos distantes. Em plantas sensíveis ao glifosato, a atividade da enzima plastídica 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) é inibida, esta enzima é responsável pela reação de condensação do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSPS) e fosfato inorgânico (Pi), na etapa de formação de corismato da rota do chiquimato (SHANER e BRIDGES, 2003).

Dois grupos de resistência, envolvendo sítio específico e sítio não específico, foram descobertos e validados. O grupo de resistência sítio específico, resulta em mutações que produzem uma enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) fracamente resistente ao glifosato. A resistência conferida para grupo sítio não específico, envolve um mecanismo de redução de translocação do herbicida para os tecidos meristemáticos (DINELLI et al., 2006; POWLES e PRESTON 2006).

Com base em investigações recentes sobre biótipos de *C. canadensis* dos EUA que apresentam resistência ao glifosato, o principal mecanismo de resistência é a baixa translocação deste herbicida para o tecido meristemático, com o seu maior acúmulo nas folhas

(FENG et al., 2004; KOGER e REDDY, 2005; DINELLI et al., 2006). Quando o herbicida é absorvido pela planta ele deve ser translocado pelos tecidos vasculares para os sítios alvos onde irá exercer a sua atividade (SATICHIVI et al., 2000). A translocação é um processo essencial para a eficácia do herbicida (WANAMARTA e PENNER, 1989). A diminuição da translocação de glifosato para o tecido meristemático é o principal mecanismo de resistência descrito para buva e para outras plantas daninhas. O glifosato move-se pelo floema, seguindo a rota dos produtos da fotossíntese, isto é, das folhas fotossinteticamente ativas, para as partes da planta que estão em crescimento (HETHERINGTON et al., 1998). Assim, mudanças na absorção do herbicida, no metabolismo e na translocação podem afetar a sensibilidade de uma planta, pois para a sua eficácia o herbicida precisa chegar ao local de ação e em uma concentração adequada.

Adicionalmente, o papel complementar de altos níveis de transcritos constitutivos para 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) foram descritos para quatro biótipos de *C. canadensis* resistentes ao glifosato (DINELLI et al., 2006). Tal como acontece com *C. canadensis*, *C. bonariensis*, *C. sumatrensis* são plantas daninhas presentes predominantemente em sistemas de cultivo de plantio direto tanto de verão como de inverno.

Os resultados de Dinelli et al. (2008) mostraram que ao nível molecular, a abundância relativa de RNAm que codifica para EPSPs antes do tratamento com glifosato foi aproximadamente o dobro em dois biótipos R quando comparados com o padrão de plantas S e outros biótipos. Além disso, os dois biótipos R que apresentaram tanto translocação e que possuem níveis duplicados de RNAm para EPSPs também apresentaram o maior índice de resistência. Estes resultados sugerem que dois fatores podem estar relacionados com resistência ao glifosato em biótipos R: (1) alteração no mecanismo de translocação para o herbicida e (2) altos níveis basais de transcrição para EPSPs.

A região conservada do gene para EPSPs, em que as mutações são conhecidas por conferir resistência ao glifosato em algumas espécies de plantas, foi amplificada a partir de amostras dos dois genótipos de plantas (S e RS), e o produto da amplificação foi seqüenciado por Chodov et al. (2009), mas estes autores não encontraram nenhuma mudança para a sequência codificadora de aminoácido, indicando que mutações em outros pontos do gene para EPSPs possam ser responsáveis pela resistência observada. Chodov et al. (2009), acreditavam que a sensibilidade reduzida ao glifosato possa ser devida às alterações na translocação do herbicida, fato este já observado em estudos de buva nos Estados Unidos por outros autores. Por outro lado a comparação entre estes resultados e os resultados obtidos anteriormente para o mecanismo de resistência ao glifosato em biótipos de *C. canadensis* dos

Estados Unidos, fizeram Dinelli et al. (2008) sugerirem que fatores agronômicos como repetidas aplicações de glifosato, sem rotações de culturas e de herbicidas e plantio direto, têm selecionado características semelhantes em diferentes grupos genéticos do gênero *Conyza* que apresentam resistência.

2.5 Diversidade Genética em plantas daninhas

Segundo os preceitos básicos da genética de populações e evolutiva, a existência de variabilidade genética em indivíduos de uma população aumenta a chance de alguns para responder diferentemente frente a alterações do meio ambiente, de modo que isto possa garantir a preservação da espécie (ALLENDORF e LUIKART, 2007).

De acordo com esse preceito, plantas daninhas com alta variabilidade genética, podem indicar que essas 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. Isso explica, ao menos em parte, porque em nível mundial, a maioria dos biotipos resistentes aos herbicidas é de espécies anuais (VIDAL e MEROTTO Jr. 2001).

O aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas está condicionado a uma mudança genética na população, imposta pela pressão de seleção, causada pela aplicação repetitiva do herbicida na dose recomendada. Da mesma forma, grandes infestações favorecem o aumento dos riscos de seleção para resistência (CHRISTOFFOLETI, et al. 2008 KISSMANN, 2003).

Vidal e Winkler (2002) descreveram que uma das características inerentes às plantas daninhas é a diversidade genética, porque se desenvolvem e evoluem em ambiente hostil. A diversidade genética é comum principalmente entre as plantas daninhas anuais, que são as espécies pioneiras na sucessão ecológica do ambiente agrícola.

Frigo et al. (2009), identificou os polimorfismos em locos α - e β -esterase em tecidos de folhas de plantas de leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) para a análise da diversidade genética e estrutura de populações. Verificaram que as populações analisadas são geneticamente estruturadas e apresenta deficiência de heterozigotos, o que pode ser o resultado da aplicação frequente do herbicida em áreas onde as sementes foram coletadas.

Circunvis et al. (2014), estimaram a variabilidade genética de amostras de *C. sumatrensis* provenientes de municípios (Guarapuava, Astorga e Nova Esperança) do Estado do Paraná, usando quatro sistemas enzimáticos (MDH, PGM, GPI e ACP). As enzimas analisadas no presente estudo indicaram que as plantas das três cidades, são geneticamente uniformes, e a uniformidade genética verificada para os locos enzimáticos é um indicativo

prévio de que é possível utilizar doses equivalentes do glifosato para controlar o crescimento desses biótipos.

Soares et al. (2015), determinaram a diversidade genética e a estrutura de população em amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis*. Os resultados desse estudo revelaram um alto valor de identidade genética entre as espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis*, o que evidência uma alta taxa de fluxo gênico entre amostras analisadas dessas espécies.

2.6 Marcadores moleculares

Até a década de 60, os estudos de polimorfismos nas populações baseavam-se em avaliações de diferentes fenótipos morfológicos dos organismos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, classificavam as populações como geneticamente homogêneas e a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica, bem como os efeitos deletérios das mutações restringiam a sua utilização. A revolução para este quadro teve início com o desenvolvimento de marcadores moleculares (MARKERT e MÖLLER, 1959).

Os marcadores moleculares apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos porque fornecerem um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma, e também por serem independentes dos efeitos ambientais e do estado fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa e precoce dos genótipos de interesse (FUTUYMA, 1992; GUIMARÃES e MOREIRA, 1999). De acordo com a definição de Ferreira e Grattapaglia (1998), um marcador molecular corresponde a qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como por exemplo, as proteínas, ou corresponde a um segmento específico de DNA (regiões expressas ou não no genoma), cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas. O interesse no uso de tais marcadores se concentra em quantificar a variabilidade genética, descrever como esta se distribui entre e dentro de populações e como esta pode ser manipulada (ROBINSON, 1998). A variabilidade contida na amostra a ser analisada dependerá do polimorfismo e da estrutura genética presente na população (MACHADO, 1982). O uso de marcadores moleculares tem sido bastante útil nos estudos de variabilidade, sendo capaz de detectar polimorfismos em várias espécies (WALDSCHMIDT et al., 2002).

O uso dos marcadores moleculares incitou o desenvolvimento de tecnologias que podem revelar variabilidades em nível genômico de uma forma rápida, simples e eficaz. O aprimoramento das técnicas de detecção de polimorfismos no DNA teve um grande avanço após o surgimento da tecnologia do DNA recombinante e a amplificação da molécula de

DNA por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), sendo que ambas as técnicas ajudaram a tornar o uso dos marcadores moleculares potencialmente ilimitados (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1995).

Os microssatélites (Simples Sequências Repetidas – SSR) têm sido usados como marcadores moleculares para avaliar polimorfismos de DNA, em estudos com finalidades diferentes, e em diversas espécies de plantas (DEMORE, 2008; CARVALHO, 2007) incluindo espécies de plantas daninhas (GOULART et al., 2011). São marcadores moleculares que consistem em motivos de sequências de 1 a 6 pares de bases que se repetem em *tandem*. Estas regiões ocorrem frequentemente e randomicamente nos genomas de plantas e animais e tipicamente exibem uma grande variação. De maneira geral, os microssatélites têm sido considerados como os marcadores moleculares mais informativos para estudos de genética em nível de espécies, porque são marcadores codominantes e altamente multialélicos, de alto polimorfismo, apresentando maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1998).

Os microssatélites apresentam numerosas vantagens quando comparados a outros tipos de marcadores, eles são altamente polimórficos, informativos, a herança é codominante o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos, apresenta ocorrência abundante em genomas de eucariotos e são altamente reproduzíveis (SALLES e BUSO, 2003). Por apresentar uma elevada taxa de mutação, um mesmo *locus* SSR em uma população, contém geralmente diversos alelos, cada um com um número diferente de repetições e isso significa que os marcadores de SSR ou microssatélite são muito úteis para discriminar indivíduos diferentes (JARNE e LAGODA, 1996). Diversos mecanismos têm sido sugeridos para explicar a elevada taxa de mutação dos microssatélites, e as alterações podem ocorrer durante a recombinação (*crossing-over* desiguais), por “derrapagem” da DNA polimerase durante a replicação, ou durante o reparo do DNA (STRAND et al., 1993).

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

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

Pesquisas feitas com o gênero *Conyza* foram realizadas recentemente por Okada et al. (2013) desenvolveu marcadores microssatélites para a espécie *C. canadensis* com o objetivo de obter informações sobre a evolução, origem e propagação da resistência. Análises da estrutura genética populacional revelaram várias origens independentes para a resistência ao glifosato dentro do Vale Central da Califórnia, C.A. USA.

Okada et al. (2015) usou os mesmos marcadores microssatélites para elucidar as origens evolutivas e a disseminação espacial da resistência, do glifosato em *C. bonariensis* no Vale Central da Califórnia, CA, USA. Nesse estudo foram analisadas trinta e cinco populações coletadas em pomares e parreirais de todo o Vale Central. Os resultados indicaram que a baixa taxa de autopolinização em *C. bonariensis*, o que segundo os autores pode explicar o aumento substancial da diversidade genética dessa espécie quando comparada com *C. canadensis*, e essa maior diversidade genética propicia um maior potencial para a evolução de biótipos resistentes em períodos de tempo mais curtos.

3. Referências

- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. **Blackwell Publishing Maden** Massachusetts, 642 p., 2007.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. v.3, p. 237-315, 1991.
- BREMER, K. Branch support and tree stability. **Cladistics**. v. 10, p. 295-304, 1994.
- BRIDGES, D. C. Glyphosate-type herbicidas. In: BRIDGES, D. C. **Herbicide action course**. West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 501-513.
- BRUCE, J.; KELLS, J. H. (*Conyza canadensis*) control. in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. **Weed Technology**. v. 4, p. 642-647, 1990.
- BUHLER, D. D.; OWEN, M. D. K. Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science** v. 45, p. 98–101, 1997.
- CARVALHO, A. Z. **Transferabilidade de microssatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose**. Pelotal: UFP, 2007. 51p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.
- CARVALHO, L. B.; **Plantas Daninhas**. Lages, 2013.
- CASE, C. N.; CRAWLEY, M. J. Effect of interspecific competition and herbivory on the recruitment of an invasive alien plant: *Conyza sumatrensis*. **Biological Invasions** v. 2, p. 103-110, 2000.
- CHRISTOFFOLETI, PEDRO JACOB ; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S., J. P.; CAETANO, A. C.; CARVALHO, J. C.; MOREIRA, M. S. Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas. 3. ed. Piracicaba: ESALQ, 2008. 120 p.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. *et al.* Herbicidas alternativos para o controle de biótipos de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) supostamente resistentes ao herbicida glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2006, 25, Brasília. **Resumos...** Londrina: **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**. p. 553, 2006.
- CHODOV D.; SALAVA, J.; MARTINCOV, O.; CVIKROV, M. Horseweed with Reduced Susceptibility to Glyphosate Found in the Czech Republic. **Journal Agricultural Food Chemical**. v. 57, n. 15, p. 6957–6961, 2009.
- CIRCUNVIS, B.C.; RENESTO, E.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S.; TAKASUSUKI, M.C.C.R. . Caracterização genética de amostras de *Conyza* sp. do estado do Paraná. **Planta Daninha**., v. 32, p. 173-179, 2014.

DAUER, J.; MORTENSEN, D. **Management implications of long-distance wind dispersal of *Conyza canadensis*. Proceedings of the 13th EWRS Symposium.** Bari, Italy: European Weed Research Society, 2005.

DAUER, J. T.; MORTENSEN, D. A.; VANGESSEL, M. J. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. **Journal of Applied Ecology** v. 44, p. 105-114, 2007.

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

DEMORA, P.S. **Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites para resistência ao oídio em soja.** Jaboticabal: UNESP, 2008. 45p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.

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

DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; CATIZONE, P.; BARNES, J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza Canadensis* (L.) Cronq. biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 86, p. 30-41, 2006.

DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; CATIZONE, P.; URBANO, J. M. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**. v. 48, p. 257-265, 2008.

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

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

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

FENG, P. C. C.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, R. D.; HECK, G. R.; CAJACOB, C. B. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**. v. 52, p. 498-505, 2004.

FRIGO, M. J.; MANGOLIN, C. A.; OLIVEIRA JUNIOR, 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.

FONTES, J. R. A.; SHIRATSUCHI, L. S.; NEVES, L. S.; JÚLIO, L.; SODRÉ-FILHO, J. **Manejo Integrado de Plantas Daninhas.** Planaltina: EMBRAPA, 2003.

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

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. ACADCOM. 2005.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers: 1982-1983. Monographs in Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden, n.13, p. 1-224, 1985.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites evolution and application**. Oxford University Press, New York, 1998.

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

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 715-740.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>, consultado em: 18/06/2015, 2015.

HETHERINGTON, P. R.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R. C.; WARNER, J. M. Absorption and efflux of glyphosate by cell suspensions. **Journal of Experimental Botany** v. 49, p. 527-533, 1998.

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

JANSEN, R. K.; PALMER, J. D. A chloroplast DNA inversion marks and ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). **Evolution**. v. 84, p. 5818-5822, 1988.

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

KISSMAN, K.G. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2003. Disponível em: http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto_resistencia_herbicidas.doc . Acesso em 13 de Maio de 2015.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Bernardo do Campo: Basf, p.152-156, 1999.

KOGER, H.; REDDY, K. N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horserweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v. 53, n. 1, p. 84-89, 2005.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: Plantio direto e convencional**. 5. ed., Nova Odessa: Plantarum 339 p., 2000.

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

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

MISSIAGGIA, A.; GRATAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multipletailed *primers*. *Genetic Molecular Research*, v. 5, p. 72-78, 2006.

MONDIN, C.A. **Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteraceas brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética.** 1ed. Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre: Pallotti, 2006.

MONTEZUMA, M. C. et al. Avaliação da suspeita de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25, 2006. Brasília. **Resumos...** Londrina: **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**, 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 canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros do estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25. Brasília, 2006. **Resumos Expandidos.** Brasília: SBCPD, 2006. (CD-ROM).

NAKAJIMA, N. J.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** v. 24, p. 471-478, 2001.

NOYES, R.D. Biogeographical and evolutionary insights on *Erigeron* and allies 799 (*Asteraceae*) from ITS sequence data. **Plant Systematics and Evolution**. v. 220, p. 93-114, 2000.

OKADA, M.; BRADLEY, D. H.; KURT J. H.; YANHUI P.; SHRESTHA, A.; STEWART JR, C. H.; STEVEN D. W.; JASIENIUUK, M. Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* in California. **Evolutionary Applications**. v. 6, p. 761-777, 2013.

OKADA, M.; BRADLEY, D. H.; KURT J. H.; YANHUI P.; SHRESTHA, A.; STEWART JR, C. H.; STEVEN D. W.; JASIENIUUK, M. Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* in California and a comparison with closely *Conyza Canadensis*. **Weed Research**. v. 55, p. 173-184, 2015.

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

PRUSKI, J. F.; SANCHÓ, G. *Conyza sumatrensis* var. *leiotheca* (Compositae: Astereae), a new combination for a common neotropical weed. **Novon** v. 16, p. 96-10, 2006.

POWLES, S. B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**. v. 20, p. 282–289, 2006.

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

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

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

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

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

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

SANTOS, G.; OLIVEIRA JR, R, S.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, C. A.; MACHADO, M, F, P, S.; MANGOLIN, C. A.; NAKAJIMA, J, N. *Conyza sumatrensis*: A new weed species resistant to glyphosate in the Americas. **Weed Biology and Management**, n. 14, p. 106-114, 2014.

SALLES, G.; BUSO, C. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites em Maçaranduba. **Circular Técnica 20 EMBRAPA**. 2003.

SATICHIVI, N.; WAX, L. M.; STOLLER, E. W.; BRISKIN, D. P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**., v. 48, n. 6, p. 675-679, 2000.

SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L.R. **Biologia e Controle de Plantas daninhas**. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior – ABEAS. Brasília, DF: ABEAS; Viçosa, MG: UFV, 2006.

SOARES, A. A. ; FREGONEZI, A. M. D. T. ; BASSI, D. ; MANGOLIN, C.A. ; COLLET, S.A.O. ; OLIVEIRA JUNIOR, R.S. ; MACHADO, MARIA F.P.S. Evidence of High Gene Flow Between Samples of *Conyza canadensis* and *C. bonariensis* as Revealed by Isozyme Polymorphisms. *Weed Scienc. In prelo*. 2015.

SHANER, D.; BRIDGES, D. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In: SHANER, D.; BRIDGES, D. **Herbicide action course**. West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 514-529.

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

STRAND, M.; PROELLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**. v.365, n.6443, p. 274-276, 1993.

THEBAUD, C.; ABBOTT, R. J. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. **American Journal of Botany** v.3, p. 360-368, 1995.

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

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; PATEL, F.; MIOTTO JR., E.; DEBASTIANI, F.; BALBINOT JR., A. A.; MOSQUEN, R. Impact of *Conyza bonariensis* density and establishment period on soyabean grain yield, yield components and economic threshold. **Weed Research Society**. v. 55, p. 34-41, 2014.

TREZZI, M. M.; BALBINOT JR., A. A.; BENIN, G.; DEBASTIANI, F.; PATEL, F.; MIOTTO JR., E. Competitive ability of soybean cultivars with horseweed (*Conyza bonariensis*). **Planta Daninha**, v. 31, n. 3, p. 543-550, 2013

USDA - United States Department of Agriculture. Selected weeds of the United States. Washington: Agriculture Research Service, Agriculture Handbook v.366, 463p, 1970.

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. 3, p. 573-578, 2007.

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

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

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. Resistência de Plantas Daninhas: Seleção ou Indução à Mutação pelos Herbicidas Inibidores de Acetolactato Sintase (ALS). **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 12, p. 31-42, jan./dez. 2002.

VIDAL, R. A.; MEROTTO JR., A. Herbicidologia. Porto Alegre: **Evangraf**, 152 p. 2001.
WALDSCHMIDT, A.M.; DE MARCO, P. JR.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L. A. O. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**. v. 62, p. 923-928, 2002.

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

WANAMARTA, G. D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Weed Science.**, v. 4, n. 2, p. 215-231, 1989.

WALKER, S. **Fleabane: summary of discussion and recommendations.** 2004. Acessado em: 12 de Julho 2013. Online. Disponível na Internet:
http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings%20_mar_04.pdf.

WSSA. Weed Science Society of America. **Weeds: Herbicide resistance.** Disponível em <http://wssa.net/weed/resistance/>. Acessado 13 mai. 2015.

WEAVER, S. E. The biology of Canadian weeds. *Conyza canadensis*. **Canadian Journal of Plant Science** v. 81, p. 867–875, 2001.

WU, H.; WALKER, S. **Fleabane: fleabane biology and control.** 2004. Acessado em: 28 jun. 2013. Online. Disponível na Internet:
http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane_proceedings%20_mar_04.pdf.

CAPÍTULO 2

Avaliação do perfil genético de regiões de microssatélites em amostras de *Conyza* spp.

Artigo elaborado e parcialmente formatado
conforme as normas para publicação
científica no periódico *Weed Research*

1. Introdução

A família Asteraceae possui cerca de 1600 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, representando cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1994). No Brasil, a família é representada por, aproximadamente, 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetais (BARROSO et al., 1991; NAKAJIMA e SEMIR, 2001).

Pertencente a essa família, o gênero *Conyza* possui aproximadamente 50 espécies e estas se encontram distribuídas por quase todo o mundo (KISSMANN e GROTH, 1999). Dentro deste gênero as espécies mais importantes para o Brasil são *C. canadenses*, *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*, conhecidas popularmente por “buva”, destacam-se por infestarem áreas abandonadas (constituídas por terrenos baldios e margens de estradas), pastagens, culturas perenes (citros e café) e lavouras anuais (algodão, milho, soja e trigo) (THEBAUD e ABBOTT, 1995). No mundo todo, estas espécies de daninhas infestam mais de 40 culturas (HOLM et al., 1997).

Conyza canadensis (L.) Cronquist é nativa da América do Norte (NOYES, 2000), está presente em quase todas as regiões do Canadá (ROULEAU e LAMOUREUX, 1992), Estados Unidos (USDA, 1970), oeste da Europa, Planície Mediterrânea (THEBAUD e ABBOTT, 1995), Austrália e Japão (HOLM et al., 1997). Também é frequente em regiões subtropicais do hemisfério sul, mas é pouco frequente em regiões tropicais (KISSMANN e GROTH, 1999).

A espécie *Conyza bonariensis* é nativa da América do Sul e é encontrada de forma abundante na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. Ela também está presente na Colômbia e na Venezuela, onde infesta lavoura de café. No Brasil, sua presença é mais intensa nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (KISSMANN e GROTH, 1999, VARGAS, et. al. 2007).

A *Conyza sumatrensis* é considerada uma espécie nativa da América do Sul, mas que se espalhou por todas as áreas tropicais e subtropicais em todos os continentes (THEBAUD e ABBOTT, 1995; PRUSKI e SANCHO 2006). Essa espécie é descrita como uma planta herbácea com ciclo anual ou bianual, sendo hexaplóide, com o número de cromossomos $2n=54$. Se reproduzem apenas por sementes, são principalmente de autopolinização (GOLDBLATT, 1985; THEBAUD et al., 1996; CASE e CRAWLEY, 2000).

O grau de interferência das plantas daninhas nas culturas depende da comunidade vegetal infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivar, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do período de convivência. Essa competição

impede o desenvolvimento normal das plantas, promove decréscimo na qualidade do produto colhido, como também provocar dificuldades durante a realização da colheita (PITELLI, 1985; LORENZI, 2000).

O gênero *Conyza* é evidentemente, propenso para evoluir genótipos que apresentam resistência ao glifosato. Este gênero evoluiu resistência para os inibidores do fotossistema II, bipiridílios (paraquat), uréias, amidas, e os inibidores da ALS e glifosato (HEAP, 2015). A grande produção de sementes (cerca de 150 mil), e a rápida dispersão destas pelo vento facilitam a rápida disseminação de resistência de *Conyza* ao longo das paisagens agrícolas do mundo (BUHLER e OWEN, 1997; WEAVER, 2001; DAUER e MORTENSEN 2005). Biótipos das três espécies de *Conyza*, também já foram relatados como resistentes ao glifosato no Brasil (CHRISTOFFOLETI et al., 2006; MONTEZUMA et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; VARGAS et al., 2007, SANTOS et al., 2014).

O aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas está condicionado a uma mudança genética na população, imposta pela pressão de seleção, causada pela aplicação repetitiva do herbicida na dose recomendada. Da mesma forma, grandes infestações favorecem o aumento dos riscos de seleção para resistência (CHRISTOFFOLETI, et al 2008; KISSMANN, 2015).

Circunvis et al. (2014), estimou a variabilidade genética de amostras de *C. sumatrensis* provenientes de municípios (Guarapuava, Astorga e Nova Esperança) do Estado do Paraná, usando quatro sistemas enzimáticos (MDH, PGM, GPI e ACP). As enzimas analisadas no presente estudo indicaram que as plantas das três municípios, são geneticamente uniformes, e a uniformidade genética verificada para os locos enzimáticos é um indicativo prévio de que é possível utilizar doses equivalentes do glifosato para controlar o crescimento desses biótipos. Soares et al. (2015), determinaram a diversidade genética e a estrutura de população em amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis*. Os resultados desse estudo revelaram um alto valor de identidade genética entre as espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis*, o que evidência uma alta taxa de fluxo gênico entre amostras analisadas dessas espécies.

Os microssatélites (Simples Sequências Repetidas – SSR) têm sido usados como marcadores moleculares para avaliar polimorfismos de DNA, em estudos com diferentes finalidades, e em diversas espécies de plantas (DEMORE, 2008; CARVALHO, 2007) incluindo espécies de plantas daninhas (GOULART et al., 2011). De maneira geral, os microssatélites têm sido considerados como os marcadores moleculares mais informativos para estudos de genética em nível de espécies, porque são marcadores codominantes e

altamente multialélicos, de alto polimorfismo, apresentando maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1998).

Pesquisas feitas com o gênero *Conyza* foram realizadas recentemente por Okada et al. (2013) com a espécie *C. canadensis* para investigar a distribuição geográfica da resistência ao glifosato em *C. canadensis* no Vale Central da Califórnia, CA, USA, e avaliar a diversidade genética e a estrutura de populações utilizando os marcadores microssatélites desenvolvidos por esse grupo de trabalho. Análises da estrutura genética populacional revelaram várias origens independentes para a resistência dentro do Vale Central.

Okada et al. (2015) usou os mesmos marcadores microssatélites para elucidar as origens evolutivas e a disseminação espacial da resistência, do glifosato em *C. bonariensis* no Vale Central da Califórnia, CA, USA. Nesse estudo foram analisadas trinta e cinco populações coletadas em pomares e parreirais de todo o Vale Central. Os resultados indicaram que a baixa taxa de autopolinização em *C. bonariensis*, o que segundo os autores pode explicar o aumento substancial da diversidade genética dessa espécie quando comparada com *C. canadensis*, e essa maior diversidade genética propicia um maior potencial para a evolução de biótipos resistentes em períodos de tempo mais curtos.

O aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas pode estar condicionado também a mudanças genéticas nas populações, impostas pela pressão de seleção, causada pela repetitiva aplicação dos herbicidas. A proposta do presente estudo foi avaliar o perfil genético de regiões de microssatélites em amostras de *Conyza* spp. coletadas de 50 diferentes localidades nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, e em função da análise da diversidade genética verificar como estas populações se encontram geneticamente estruturadas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material Biológico

As sementes de *Conyza* spp. utilizadas no presente estudo foram coletadas em 50 localidades nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Figura 1), organizadas em *bulk*, armazenadas em sacos de papel e encaminhados a Universidade Estadual de Maringá. Para a análise foram utilizados 10 amostras de cada ponto de coleta, totalizando 500 amostras (Tabela 1).

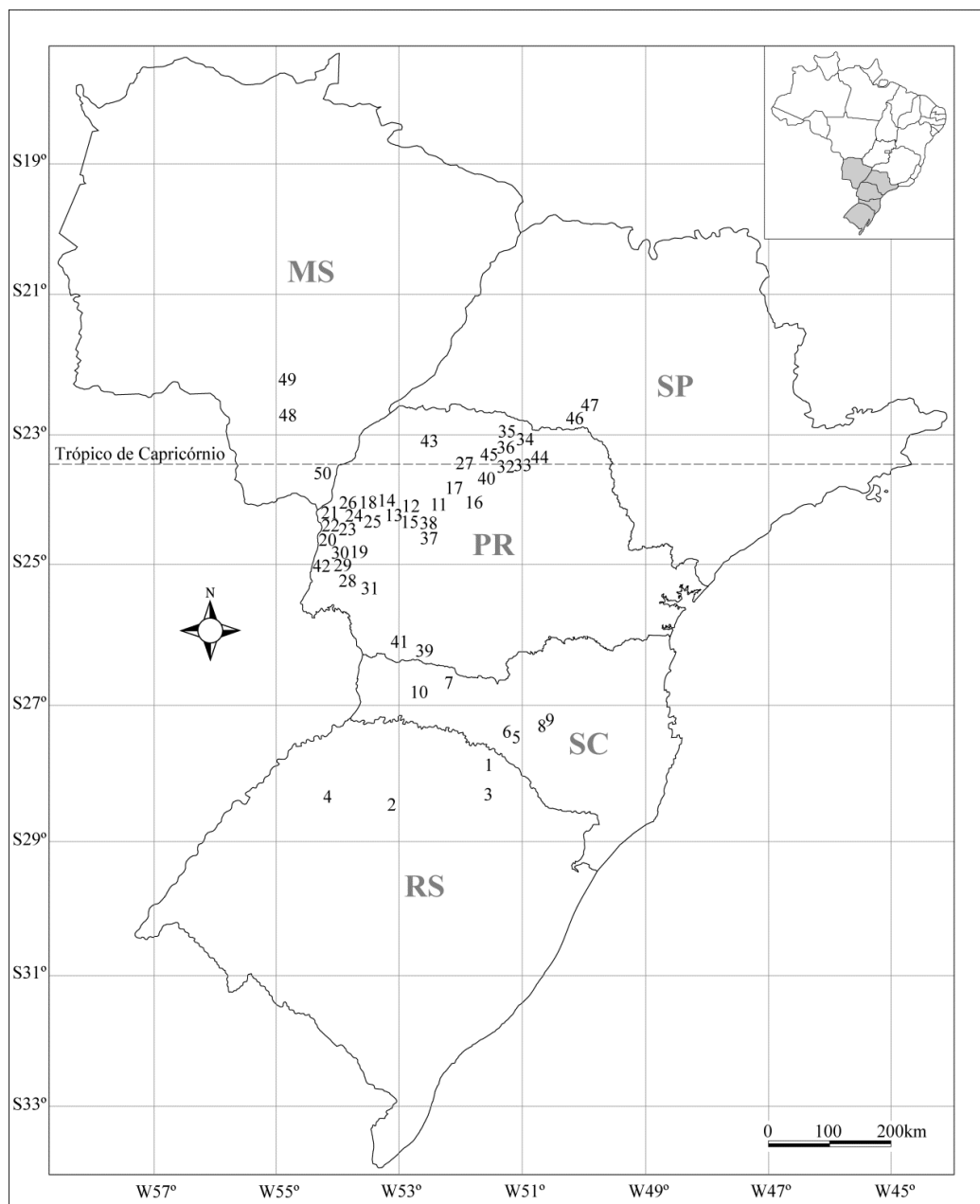


Figura 1: Mapa dos pontos de coletas de sementes de *Conyza* sp; 1 São José do Ouro, 2 Saldanha Marinho, 3 Lagoa Vermelha, 4 Santo Ângelo, 5 Campos Novos¹, 6 Campos Novos², 7 Abelardo Luz, 8 Curitibaanos¹, 9 Curitibaanos², 10 Quilombo, 11 Campo Mourão, 12 Janiópolis, 13 Goioerê, 14 Mariluz, 15 Rancho Alegre D'Oeste, 16 São João do Ivaí, 17 Quinta do Sol, 18 Alto Piquiri, 19 Toledo, 20 Mal. Cândido Rondon, 21 Guaíra¹, 22 Guaíra², 23 Palotina¹, 24 Palotina², 25 Brasilândia do Sul, 26 Francisco Alves, 27 Maringá, 28 Céu Azul, 29 Ouro Verde do Oeste¹, 30 Ouro Verde do Oeste², 31 Lindoeste, 32 Londrina¹, 33 Londrina², 34 Sertãoópolis, 35 Bela Vista do Paraíso, 36 Cambé, 37 Mamborê¹, 38 Mamborê², 39 Pato Branco, 40 Cambira, 41 Francisco Beltrão, 42 Santa Helena, 43 Tamboara, 44 Assaí, 45 Rolândia, 46 Palmital, 47 Campos Novos Paulistas, 48 Caarapó, 49 Itaporã e 50 Itaquiraí.

Tabela 1. Pontos de coletas de sementes de *Conyza spp* dos quais foram obtidas as amostras utilizadas para a avaliação da diversidade genética com o marcador molecular microsatélite.

Estado	Municípios	Amostras	Número de Plantas	Coordenadas Geográficas
Rio Grande do Sul Brasil	São José do Ouro	1	10	27°48'15.09" S 51°34'30.09" O
	Saldanha Marinho	2	10	28°21'22.31" S 53°5'32.63" O
	Lagoa Vermelha	3	10	28°13'15" S 51°35'47" O
	Santo Ângelo	4	10	28°17'56" S 54°15'46" O
Santa Catarina Brasil	Campos Novos ¹	5	10	27° 25'06" S 51°09'18" O
	Campos Novos ²	6	10	27°21'58" S 51°18'35" O
	Abelardo Luz	7	10	26°38'53" S 52°12'06" O
	Curitibanos ¹	8	10	27°15'45" S 50°36'34" O
	Curitibanos ²	9	10	27°15'35" S 50°36'19" O
	Quilombo	10	10	26°46'42" S 52°42'11" O
	Campo Mourão	11	10	24°13'10" S 52°14'29.4" O
Paraná Brasil	Janiópolis	12	10	24°01'52.1" S 52°49'1.3" O
	Goioerê	13	10	24°13'45.8" S 52°56'52.8" O
	Mariluz	14	10	24°06'58.9" S 53°12'49.7" O
	Rancho Alegre D'Oeste	15	10	24°14'26" S 52°52'20.9" O
	São João do Ivaí	16	10	23°56'7.6" S 51°48'33.9" O
	Quinta do Sol	17	10	23°48'26.3" S 52°10'36.3" O
	Alto Piquiri	18	10	24°03'32.2" S 53°29'05.9" O
	Toledo	19	10	24°36'03.7" S 53°42'50" O
	Mal. Cândido Rondon	20	10	24°29'58.7" S 54°17'12.5" O
	Guaíra ¹	21	10	24°13'43.7" S 54°17'19.2" O
	Guaíra ²	22	10	24°08'42.0" S 54°16'48.7" O

São Paulo Brasil	Palotina ¹	23	10	24°15'41.3" S 53°48'01.3" O
	Palotina ²	24	10	24°14'13.4" S 53°46'27.4" O
	Brasilândia do Sul	25	10	24°13'04.1" S 53°34'39.2" O
	Francisco Alves	26	10	24°05'11.9" S 53°54'25.0" O
	Maringá	27	10	23°25'30"S 51°56'20"O
	Céu Azul	28	10	25°10'35" S 53°55'30" O
	Ouro Verde do Oeste ¹	29	10	24°48'35.3" S 53°54'57.7" O
	Ouro Verde do Oeste ²	30	10	24°48'35.3" S 53°54'57.7" O
	Lindoeste	31	10	25° 10'29.2" S 53°35'05.8" O
	Londrina ¹	32	10	23°27.7'29" S 51°09.1'52" O
	Londrina ²	33	10	23°28.1'25" S 50°59.3'8" O
	Sertanópolis	34	10	22°58'59.43" S 51°08'34.03" O
	Bela Vista do Paraíso	35	10	23°01.52'8" S 51°14.68'3" O
	Cambé	36	10	23°04.89'9" S 51°17.20'9" O
	Mamborê ¹	37	10	24°26'53.3" S 52°33'30.6" O
	Mamborê ²	38	10	24°01'45.6" S 52°36'59.8" O
	Pato Branco	39	10	26°13'44" S 52°40'15" O
	Cambira	40	10	23°34'58"S 51°34'40" O
	Francisco Beltrão	41	10	26° 4' 51" S 53° 3' 18" O
	Santa Helena	42	10	24°53' 11.6" S 54°22' 45.0" O
	Tamboara	43	10	23°8'42.57" S 52°31'19.09" O
	Assaí	44	10	23° 22' 22" S 50° 50' 27" O
	Rolandia	45	10	23° 18' 36" S 51° 22' 08" O
	Palmital	46	10	22°45.29'01" S 50°11.31'06" O
	Campos Novos Paulistas	47	10	22°35.52'01"S 50°04.50'4" O

Mato Grosso do Sul Brasil	Caarapó	48	10	22°30'59.1" S 54°45'27" O
	Itaporã	49	10	22°04'30" S 54°46'30" O
	Itaquiraí	50	10	23°38'38" S 54°11'40" O
	Total	50	500	

2.2 Plantio e coleta e armazenamento das plantas

Para a germinação, as sementes de cada local, foram distribuídas aleatoriamente em vasos de 500 mL contendo solo estéril e mantidas à temperatura ambiente em casa de vegetação no CTI (Centro de Treinamento e Irrigação) da Universidade Estadual de Maringá e irrigadas diariamente (Figura 2). Aproximadamente 30 dias após a emergência as folhas das plantas foram coletadas e acondicionadas em papелotes de papel alumínio, em seguida congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer -80°C.



Figura 2. Tamanho aproximado das plantas de *Conyza spp* utilizadas para a extração de DNA.

2.3 Extração do DNA

A extração de DNA de plantas de *Conyza spp* foi realizada utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) e modificado por Cullings (1992). Para a extração de DNA foi utilizado aproximadamente 50 mg de folhas que foram trituradas utilizando nitrogênio líquido, em seguida foi adicionado 500 µL de Tampão CTAB de extração (Tabela 2). As amostras foram incubadas em banho-maria na temperatura de 55 °C por um período de 1 hora. Em seguida foi realizada uma lavagem com 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico na

proporção de 24:1. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos com 14.000 r.p.m. para a separação da fase aquosa. Após esse processo foi adicionado 0,08 vezes do volume recuperado de acetato de amônia 7,5 M gelado, e 0,54 do volume de isopropanol gelado e incubadas em temperatura de -20 °C por um período de 1 hora.

As amostras foram lavadas novamente com etanol 70% por duas vezes e uma vez com etanol 95% gelado. Em seguida as amostras foram ressuspensas com 50 µL de tampão TE tampão (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) e mantidas em um freezer a -20°C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro UV-visível modelo Picodrop®, para uso nas reações as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng/µL.

Tabela 2. Tampão utilizado para o processo de extração de DNA das amostras de *Conyza* segundo a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990) e modificada por Cullings (1992).

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

2.4 Análise dos locos microsatélites via PCR

Para a amplificação dos locos de microsatélites foram testados 12 pares de *primers* de microsatélites: HW02, HW04, HW06, HW07, HW14, HW21, HW27, HW29 (ABERCOMBIE et al., 2009), HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR09, (OKADA et al., 2013).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well, Applied Biosystems. As reações foram realizadas em placas multiplex, sendo utilizado para a reação 2 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 1U de Taq-DNA Polimerase (Invitrogen), 0,4 µM de cada um dos *primers Forward* e *Reverse* específicos e água mili-Q para um volume final de 20 µL de solução.

Os ciclos de PCR foram realizados com uma desnaturação inicial das amostras com 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94 °C por 40 segundos; o anelamento foi realizado com 55 °C por 40 segundos e a extensão foi com 72 °C por trinta segundos, foram realizados 34 ciclos com estas três etapas e a extensão final em 72 °C por 30 segundos.

Após a amplificação as amostras foram aplicadas em gel de agarose com concentração de 4%, preparado com 50% de agarose *UltraPure™* Invitrogen e 50% de agarose

MetaphorTM Lonza . O gel foi corado em banho de Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob luz UV, usando um fotodocumentador L-Pix HE (Loccus) utilizando o software L-Pix Image.

2.5 Análise estatística

A partir do padrão de bandas obtido para cada loco de microsatélites foram calculados os índices de diversidade em cada população estudada. A variabilidade genética foi estimada por meio de uma estatística descritiva que determinou o número de locos polimórficos, número de alelos por loco, número efetivo de alelos por loco, número efetivo de alelos (N_e) que foi estimado como $N_e = 1/(1-H_o)$, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), distância genética entre populações, frequências alélicas e o afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco; todos estes parâmetros foram calculados utilizando o programa POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999). Neste mesmo programa, foi construído um dendrograma e uma matriz de distância e identidade genética de Nei (1972) usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*).

Foi utilizado também o programa STRUCTURE v 2.3.2. (PRITCHARD et al., 2000), que baseia-se na determinação de grupos heteróticos a partir de dados moleculares. Evanno et al. (2005) sugeriram estimar ΔK como:

$$\Delta K = \frac{\{avg [L(K+1)] - 2avg [L(K)] + avg [L(K-1)]\}}{sd [L(K)]}$$

Onde *avg* é a media aritmética nas repetições e *sd* é o desvio padrão da repetição $L(K)$. O valor de K corresponde ao valor médio da distribuição de ΔK (RODRÍGUEZ-RAMILO et al., 2009).

Por meio desses conceitos, foi realizada a análise implementada pelo programa STRUCTURE v. 2.3.2. (PRITCHARD et al., 2000), que tem como base o modelo de separação de grupos (*clusters*), que atribui indivíduos a um número K de populações, com base na estimativa Bayesiana em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados, dentro de cada população. Esta análise foi realizada com valor de *length burning* de 5000, com valor de MCMC de 50.000 e valor de corte de 10%; foram testados de K= 2 a K= 20. O *software* STRUCTURE HARVESTER v.0.6.1 (EARL e VON, 2009) foi usado para processar os arquivos de resultados do STRUCTURE v 2.3.2. O programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse 2006) foi utilizado para calcular a percentagem de variância molecular dentro e entre as populações, por meio da análise da variância molecular (AMOVA). Com este programa, também foram

construídas as matrizes de distância genética e a de distância geográfica. A correlação entre estas matrizes foi calculada utilizando o teste de Mantel. Para estimar a diversidade genética dentro das populações usando os 10 locos de microssatélites, riqueza alélica (A), He, Ho, Fis foram calculados para cada população usando o programa Fstat 2.9.3 (Goudet, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do DNA e da diversidade genética entre as plantas e *Conyza* sp.

A metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990) e modificado por Cullings (1992), empregando-se folhas como material biológico, utilizada no presente trabalho foi eficiente para produzir DNA de qualidade para a amplificação, utilizando *primers* microssatélites, e os resultados destas amplificações foram reproduzíveis. As concentrações de DNA nas amostras de *Conyza* spp. variaram de 34,2 ng/μL a 1550,6 ng/μL.

Para avaliar a diversidade genética dentro e entre as populações de *Conyza* spp., foram testados um total de 12 pares de *primers* microssatélite. Destes, 10 foram selecionados (Figura e Tabela 3) estes apresentaram locos bem definidos e com a possibilidade de avaliar os diferentes alelos destes locos entre as amostras amplificadas.

A análise dos dez locos de microssatélites em 500 amostras de plantas de diferentes localidades de *Conyza* spp. resultaram na amplificação de 42 alelos, com uma média de 4,2 alelos por loco polimórfico. O *primer* HWSSR01 apresentou o maior número de alelos (6). Cinco alelos foram identificados usando os *primers* HW02, HW21, HW27, quatro alelos usando os *primers* HW04, HW06, HWSSR03 e HWSSR04, três alelos com o *primer* HWSSR09. O *primer* HW29 apresentou o menor número de alelos (2) (Tabela 3).

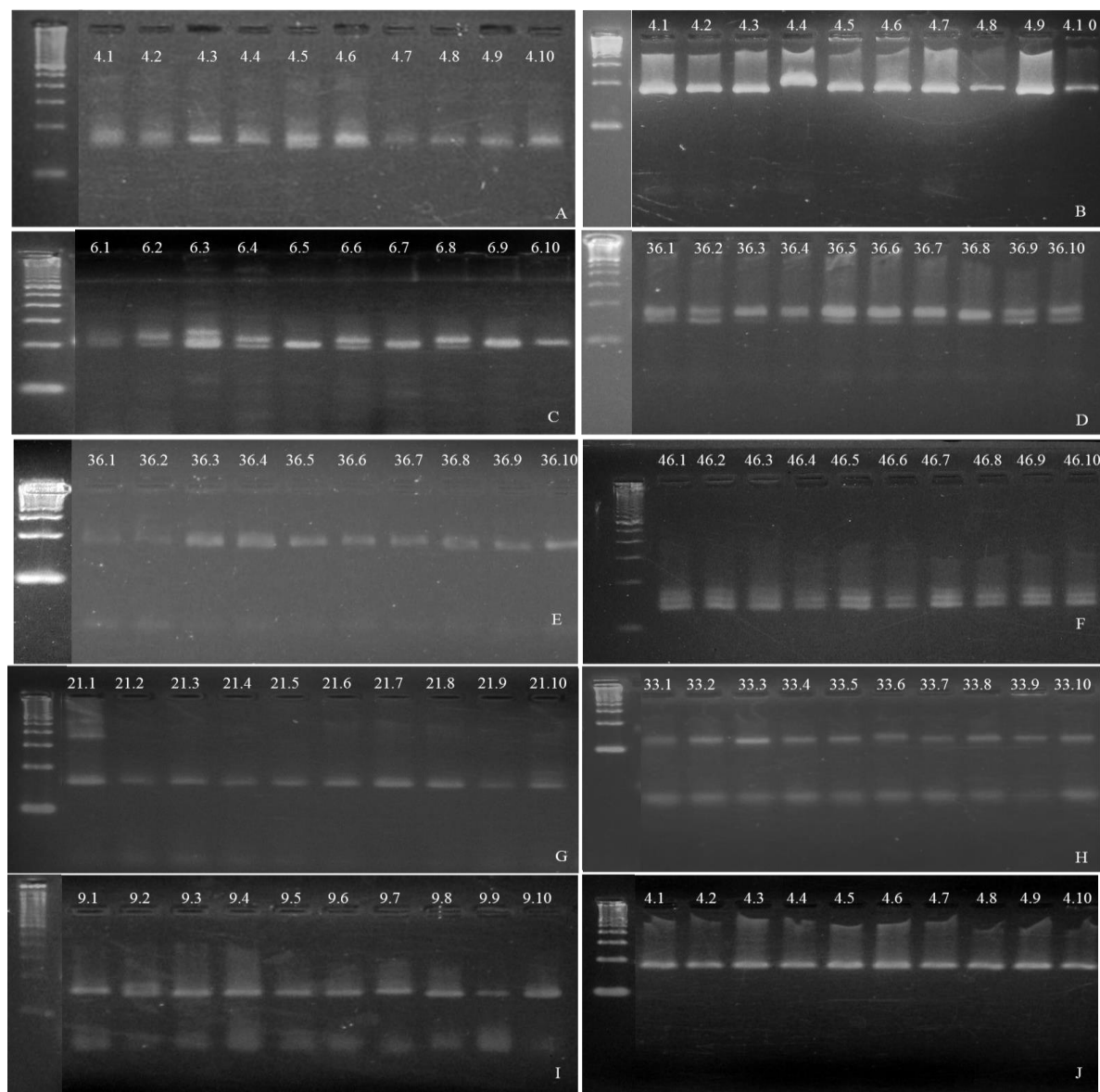


Figura 3. Geis de agarose concentrado 4% (50% agarose comum e 50% agarose Metaphor) para separar o produto da amplificação dos DNAs de diferentes plantas das populações de *Conyza* spp com os *primers* **A)** HW02, **B)** HW04, **C)** HW06, **D)** HW21, **E)** HW27, **F)** HW29, **G)** HWSSR01, **H)** HWSSR03, **I)** HWSSR04, **J)** HWSSR09. A primeira amostra do gel indica o marcador ladder 100 pb (Invitrogen), as demais amostras indicam os alelos (homozigotos e heterozigotos) presentes nas plantas das diferentes populações.

Tabela 3. *Primers* de Microssatélites usados para a análise de plantas de *Conyza* spp. repetições amplificadas para cada microssatélite e o número de alelos por locos

<i>Primer</i>	Sequencia de nucleotídeos	Tipo de repetição	Número de alelos
HW02	F: AGTATTTGGCAATCAAAATTCG R: TCACAATCACAACACACAAA	(AC) ₁₇ (AT) ₈	5
HW04	F: GCCACCCTATTGTTTTGGTTAT R: AACTTGCAATGGTAGTCAACGTC	[(CA) ₃] ₁₄ (AT) ₇	4
HW06	F: CTTGCATGGTAGTCAACGTCAT R: CAGAGGTGGTCATGTGATGTG	(AT) ₇ (GT) ₆ (GT) ₆ (CT) ₁₀	4
HW21	F: ATAGTCGAATTGGTCACGATTTG R: GCAGTTTTCACTCTTCTCTCGAA	(CA) ₁₃	5
HW27	F: TTTCATAGTCGAATTGGTCACG R: CCGGTAGCAGTTTTCACTCTTC	(CA) ₁₄	5
HW29	F: CTACTTGTTCAATTTATCCATAC R: AAACCTGGTTACTTCTCTTCC	(AC) ₇ (ATAC) ₂₂	2
HWSSR01	F: TATGTTGTACGACTGACTGAGATC R: CCATTGACTGTAGACCAAGTGTG	(CTAT) ₂₁	6
HWSSR03	F: TTGACTCCAACCTCGTAGTGTATG R: ACGTTAAATCTCTCGTGTCTTC	(TG) ₇ (GTATAT) ₇	4
HWSSR04	F: GGAAAACTCCTGTCATAGTATTAGC R: ATTAAAATCTAGCAAGGCCGAAC	(AAT) ₁₈	4
HWSSR09	F: CATGAGTTTGAGTTATCCCAGAT R: CGAATACTTTCAATGCTTACGAC	(AATTT) ₅	3

Para o loco de microssatélite *HWSSR01* foi observado alelos nulos, isto é, após quatro tentativas de amplificação não foi observado o produto da amplificação. Esta ausência de amplificação deve ocorrer em função de alterações nas regiões complementares aos *primers* de microssatélite. Uma vez que este *primer* não anelou, não foi observado produto de amplificação. Foram observados alelos nulos para plantas de 16 populações sendo que a frequência deste alelo variou de 0,1000 (populações 1, 3, 5, 12, 19, 22, 28, 45) a 0,7000 (população 39). A frequência global de alelos nulos para as 50 populações foi de 0,0680.

Para quase todos os locos estudados foram observados alelos com frequência igual a 1,000 ou (locos monomórficos), portanto, são alelos fixos, (Tabela 4); o único loco que não apresentou alelo fixado foi o loco *HW29*. No loco *HW02* o alelo “*b*” encontra-se fixado nas populações 11 e 17, alelo “*c*” nas populações 37, 46 e 48, e o alelo “*e*” somente na população 1. No loco *HW04* o alelo “*a*” foi fixado nas populações 9, 10, 37, 39, 41, 43, 46, 49, 50 e o alelo “*b*” nas populações 11 e 36. Somente o alelo “*b*” está fixo no loco *HW06* nas populações 1, 2, 9, 10, 18, 19, 49, 50. Para o loco *HW21* o alelo “*a*” está fixado nas populações 2 e 50, alelo “*b*” nas populações 11, 23, 27, e 37, e alelo “*c*” somente na população 46. O loco *HW27* foi o que apresentou o maior número de populações com alelos monomórficos (16), onde o alelo “*a*” está fixado nas populações 2, 3, 19, 49 e 50, o alelo “*b*” nas populações 38, 39, 43, 44, 46 e 48, e o alelo “*c*” nas populações 4, 26, 33, 35 e 36. No loco *HWSSR01* o alelo “*a*” encontra-se fixado nas populações 11, 15, 17, 21, 37 e 48 e o alelo

“*d*” na população 46; esse foi o único loco que apresentou o alelo “*d*” fixado. No loco amplificado com o *primer* HWSSR03 o alelo “*a*” foi observado fixado nas populações 11 e 46 e o alelo “*b*” nas populações 41, 47 e 48. No loco HWSSR04 os alelos “*b*” e “*c*” estão fixados: “*b*” nas populações 2, 4, 6, 17, 24 e 40 e o alelo “*c*” somente na população 15. No loco HWSSR09 o alelo “*a*” está fixado na população 48, o alelo “*b*” está fixado nas populações 2, 3, 4, 8, 9, 17, 37 e 48 e o alelo “*c*” nas populações 11, 47 e 50. A população 37 (Mamborê¹-PR) foi a que apresentou o maior número de locos com alelos fixados, 7 no total de 10, seguida pelas populações 11 (Campo Mourão -PR) e 46 (Palmital-SP) (com 6 locos).

A fixação de alelos é um parâmetro que é usado frequentemente para estimar a resposta genética a processos de seleção de genótipos, e é decorrente de uma redução na variabilidade genética (Carneiro et al., 2006; 2007). No melhoramento genético assistido por marcadores moleculares, a fixação de alelos é usada de forma associada com características fenotípicas favoráveis no decorrer de um determinado número de gerações. Em *Conyza* spp. os alelos HW04^a, HW06^b, e HWSSR09^b foram fixados em 18% para o primeiro e em 16% das populações analisadas para os dois últimos. A Tabela 4 ilustra um processo de fixação dos 21 alelos aleatória nas 33 populações de *Conyza* spp., sugerindo que a fixação de alelos nestas populações pode ser decorrente de deriva genética, ou de processos de seleção diferenciais nas entre as diferentes populações. A hipótese de deriva genética é um mecanismo plausível para populações de *Conyza* spp. as quais podem sofrer efeitos gargalo (por ação de herbicidas que reduz periodicamente o tamanho da população) e/ou efeito fundador (por dispersão de amostras e invasão de novas áreas).

O polimorfismo entre as 50 populações analisadas variou de 30% a 100%. As populações com maior polimorfismo foram: 5, 7, 12, 13, 14, 16, 20, 22, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 42 e 45 com 100% dos locos polimórficos. A população com menor polimorfismo foi a 37 (Mamborê-PR) com 30% de locos polimórficos (Tabela 5). Dentro das populações a riqueza alélica (*A*) variou de 1,4 (11-Campo Mourão -PR) a 3,1 (29-Ouro Verde do Oeste¹-PR). A heterozigosidade média observada variou de 0,0800 na população 33 (Londrina-PR), a 0,4200 na população 29 (Ouro Verde do Oeste¹-PR). A heterozigosidade média esperada estimada pelo índice de Nei foi de 0,6287, e a heterozigosidade média observada (*He*) foi de 0,2222, portanto houve uma grande diferença entre o esperado e o observado para os fenótipos heterozigotos. No loco HW27 o alelo “*e*” (0,250) foi exclusivo da população 8 (Curitibanos¹-SC) e no loco HWSSR04 o alelo “*d*” (0,100) foi exclusivo da população 13 (Goioerê-PR).

Tabela 4: Alelos fixados nos 10 locos de microssatélites analisados nas 50 populações de *Conyza* spp.

[illegible]

44	Assaí-PR					100						1										
46	Palmital-SP	100	100		100	100	100	100				6										
47	Campos Novos Paulista-SP										100	1										
48	Cararapó-MS	100				100	100	100		100		5										
49	Itaporã-MS		100	100		100				100		4										
50	Itaquaraí-MS		100	100	100	100					100	5										
Total por alelos		2	3	1	9	2	8	2	4	1	5	6	5	6	1	2	3	6	1	1	8	3

Tabela 5: Parâmetros médios de diversidade genética avaliados nas 50 populações de *Conyza* spp. e obtidos mediante análise dos dez locos microssatélites, onde P: Proporção de locos polimórficos; Na: número médio de alelos observados; Ne: número efetivos médio de alelos; Hom Obs: Homozigosidade Observada; Hom Esp: Homozigosidade Esperada Ho: heterozigosidade média observada; Nei: heterozigosidade média esperada; A: Riqueza Alélica;

	Populações	P	Na	Ne	Hom Obs	Hom Esp	Ho	Nei	A
1	São José do Ouro-RS	80%	1,9	1,4061	0,8700	0,7395	0,1300	0,2475	1,9
2	Saldanha Marinho-RS	50%	1,8	1,5189	0,8600	0,7532	0,1400	0,2345	1,8
3	Lagoa Vermelha-RS	80%	2,3	1,8311	0,8600	0,6042	0,1400	0,3760	2,3
4	Santo Ângelo-RS	80%	2,2	1,6412	0,7600	0,6389	0,2400	0,3430	2,2
5	Campos Novos ¹ -SC	100%	3,0	1,9596	0,8700	0,5258	0,1300	0,4505	3,0
6	Campos Novos ² -SC	90%	3,0	2,2682	0,7400	0,4874	0,2600	0,4870	3,0
7	Abelardo Luz-SC	100%	3,0	2,4195	0,7400	0,4195	0,2600	0,5515	3,0
8	Curitibanos ¹ -SC	80%	2,1	1,6598	0,7700	0,6316	0,2300	0,3500	2,1
9	Curitibanos ² -SC	70%	2,4	1,8427	0,7600	0,6116	0,2400	0,3690	2,4
10	Quilombo-SC	80%	2,1	1,6241	0,7500	0,6742	0,2500	0,3095	2,1
11	Campo Mourão -PR	40%	1,4	1,3374	0,8500	0,8111	0,1500	0,1795	1,4
12	Janiópolis-PR	100%	2,6	1,8421	0,7600	0,5358	0,2400	0,4410	2,6
13	Goioerê-PR	100%	2,9	2,239	0,6900	0,4579	0,3100	0,5150	2,9
14	Mariluz-PR	100%	2,7	2,0929	0,8000	0,5321	0,2000	0,4445	2,7
15	Rancho Alegre D'Oeste-PR	80%	2,1	1,5957	0,7200	0,6821	0,2800	0,3020	2,1

16	São João do Ivaí-PR	100%	2,6	1,7292	0,8300	0,5711	0,1700	0,4075	2,6
17	Quinta do Sol-PR	60%	1,7	1,3244	0,8700	0,7984	0,1300	0,1915	1,7
18	Alto Piquiri-PR	90%	2,4	1,7185	0,8600	0,5958	0,1400	0,3840	2,4
19	Toledo-PR	80%	2,5	1,8136	0,7700	0,6084	0,2300	0,3720	2,5
20	Mal. Cândido Rondon-PR	100%	2,8	2,1347	0,7700	0,4779	0,2300	0,4960	2,8
21	Guaíra ¹ -PR	90%	2,2	1,6069	0,7500	0,6616	0,2500	0,3215	2,2
22	Guaíra ² -PR	100%	3,1	2,3196	0,6000	0,4568	0,4000	0,5160	3,1
23	Palotina ¹ -PR	90%	2,1	1,6843	0,8400	0,6347	0,1600	0,3470	2,1
24	Palotina ² -PR	90%	2,4	1,8302	0,8600	0,6086	0,1400	0,3715	2,4
25	Brasilândia do Sul-PR	100%	2,4	1,7106	0,6800	0,6105	0,3200	0,3700	2,4
26	Francisco Alves-PR	90%	2,2	1,911	0,8000	0,5453	0,2000	0,4320	2,2
27	Maringá-PR	90%	2,1	1,5824	0,8100	0,6705	0,1900	0,3130	2,1
28	Céu Azul-PR	100%	2,5	1,9407	0,7400	0,5312	0,2600	0,4445	2,5
29	Ouro Verde do Oeste ¹ -PR	100%	3,1	2,4022	0,5800	0,4174	0,4200	0,5535	3,1
30	Ouro Verde do Oeste ² -PR	100%	3,1	2,2761	0,6700	0,4574	0,3300	0,5155	3,1
31	Lindoeste-PR	100%	2,4	1,874	0,6500	0,5337	0,3500	0,4430	2,4
32	Londrina ¹ -PR	100%	2,8	2,0763	0,6400	0,4805	0,3600	0,4935	2,8
33	Londrina ² -PR	90%	2,0	1,477	0,9200	0,6937	0,0800	0,2910	2,0

34	Sertanópolis-PR	100%	2,6	2,0655	0,6800	0,4947	0,3200	0,4800	2,6
35	Bela Vista do Paraíso-PR	90%	2,0	1,544	0,8100	0,6711	0,1900	0,3125	2,0
36	Cambé-PR	80%	2,0	1,6252	0,8400	0,6511	0,1600	0,3315	2,0
37	Mamborê ¹ -PR	30%	1,4	1,1735	0,9000	0,8926	0,1000	0,1020	1,4
38	Mamborê ² -PR	90%	2,3	1,8241	0,8400	0,5942	0,1600	0,3855	2,3
39	Pato Branco-PR	90%	2,3	1,6772	0,8000	0,6468	0,2000	0,3355	2,3
40	Cambira-PR	90%	2,4	1,6813	0,7200	0,6305	0,2800	0,3510	2,4
41	Francisco Beltrão- PR	80%	2,0	1,5207	0,6900	0,6911	0,3100	0,2935	2,0
42	Santa Helena-PR	100%	2,1	1,7629	0,7400	0,5837	0,2600	0,3955	2,1
43	Tamboara-PR	80%	2,1	1,6128	0,8200	0,6616	0,1800	0,3215	2,1
44	Assaí-PR	90%	2,1	1,5368	0,8400	0,6758	0,1600	0,3080	2,1
45	Rolandia-PR	100%	2,4	1,8211	0,8100	0,5716	0,1900	0,4070	2,4
46	Palmital-SP	40%	1,4	1,2305	0,9000	0,8663	0,1000	0,1270	1,4
47	Campos Novos Paulistas-SP	50%	2,2	1,8659	0,8100	0,5668	0,1900	0,4115	2,2
48	Caarapó-MS	50%	1,6	1,4587	0,7200	0,7674	0,2800	0,2210	1,6
49	Itaporã-MS	60%	1,9	1,639	0,7500	0,6763	0,2500	0,3075	1,9
50	Itaquiraí-MS	50%	1,6	1,537	0,7800	0,7316	0,2200	0,2550	1,6
Média			4,2	2,7656	0,7778	0,3706	0,2222	0,6287	2,3

A homozigosidade observada foi maior do que a esperada, o índice de homozigosidade observada (Hom Obs) foi de 0,7778, e a esperada foi de 0,3706, esse fato indica que existe uma porcentagem maior de locos monomórficos nas populações avaliadas. O déficit de heterozigotos também foi indicado pelos valores positivos para o coeficiente de endogamia (Fis). O loco *HW29*, foi o único que apresentou Fis negativo (-0,8954), indicando um excesso de heterozigotos. Os demais locos apresentaram valores positivos e a média para o Fis foi de 0,3899. O excesso de heterozigotos foi observado apenas na população 41 (-0,004) coletada em Francisco Beltrão-PR, e na população 48 (-0,217) coletada em Caarapó-MS. As 50 populações de *Conyza* spp coletadas nos cinco diferentes estados do Brasil apresentaram uma alta divergência genética evidenciado pelo elevado valor de F_{ST} (0,4208). De acordo com o postulado de Wright (1978), valores de F_{ST} menores ou igual a 0,05 correspondem a uma diferenciação genética baixa; valores entre 0,05 a 0,15 correspondem a uma diferenciação genética moderada; valores entre 0,15 a 0,25 correspondem a uma alta diferenciação genética, e maiores do que 0,25 são encontrados quando as frequências dos alelos nas populações comparadas são altamente divergentes. Foi detectado um nível relativamente elevado de diferenciação entre as populações de *Conyza* spp., sugerindo que as 50 populações formam populações geneticamente estruturadas. A análise dos dados realizada no programa GenAlEx 6.5 mostrou a porcentagem de variância molecular dentro e entre as populações de *Conyza* (Tabela 6). A variância molecular observada entre as 50 populações foi 46%, e a variância molecular observada dentro das 50 populações avaliadas foi de 54%. A análise da variância molecular é também um indicativo de que as populações analisadas são geneticamente estruturadas.

Tabela 6. Análise da variância molecular (AMOVA), valores de grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), variância e porcentagem de variância molecular dentro e entre as populações de *Conyza* spp.

Fontes de Variação	GL	SQ	Variância	%
Entre as Populações	49	2645,558	53,991	46%
Dentro das Populações	450	2530,800	5,624	54%
Total	499	5176,358		100%

O valor do fluxo gênico ($Nm = 0,3441$) indica um fluxo gênico intermediário. De acordo com Govindaraju (1989), os valores de $Nm > 1,0$ indicam alto fluxo gênico entre as populações; $Nm < 0,25$ indicam um fluxo baixo de genes e valores que variam de 0,25 - 0,99 indicam um fluxo gênico intermediário (Tabela 7). Cada planta de *Conyza* é capaz de produzir

mais de 200.000 sementes que podem se dispersar pelo vento ou pela água (DAVIS et al., 2009), sendo que regularmente a sua dispersão pode atingir de 100 a 500 metros da planta de origem (DAUER et al., 2007) e podem se deslocar a uma distância de 2 a 122 km (DAUER et al., 2009). Este fluxo gênico intermediário ainda pode ser realizado pela dispersão de sementes promovida pelo intercâmbio entre as máquinas e equipamentos de controle e de colheita.

Tabela 7: Parâmetros médios de coeficiente de endogamia (Fis), proporção de diversidade gênica entre as populações (Fst), fluxo gênico entre as populações (Nm) avaliados para os dez locos SSRs

Locos	Fis	Fst	Nm
HW02	0,6106	0,4403	0,3178
HW04	0,6110	0,4104	0,3592
HW06	0,4820	0,3769	0,4132
HW21	0,3584	0,5212	0,2297
HW27	0,5703	0,6453	0,1374
HW29	-0,8954	0,0204	12,0000
HWSSR01	0,7107	0,3790	0,4096
HWSSR03	0,7894	0,3891	0,3926
HWSSR04	0,7625	0,3685	0,4283
HWSSR09	0,2771	0,5412	0,2120
Média	0,3899	0,4208	0,3441

Os valores de similaridade genética variaram de 0,1644, entre as plantas das populações 1 (São José do Ouro-RS) e 27 (Maringá-PR) à 0,9174 entre as plantas das populações 23 (Palotina¹-PR) e 38 (Mamborê²-PR). O dendrograma obtido a partir da análise das similaridades genéticas mostra a formação de dez grupos (Figura 4). O baixo valor obtido para o teste de Mantel $R^2 = 0,1032$, realizado com o programa GenAlEx 6.5, foi obtido comparando a matriz de distância genética e a de distância geográfica. O resultado obtido mostra que a diferenciação encontrada para as 50 populações não está relacionada com a distância geográfica que separa as mesmas. Este resultado pode ser observado nos grupos formados no dendrograma (Figura 3).

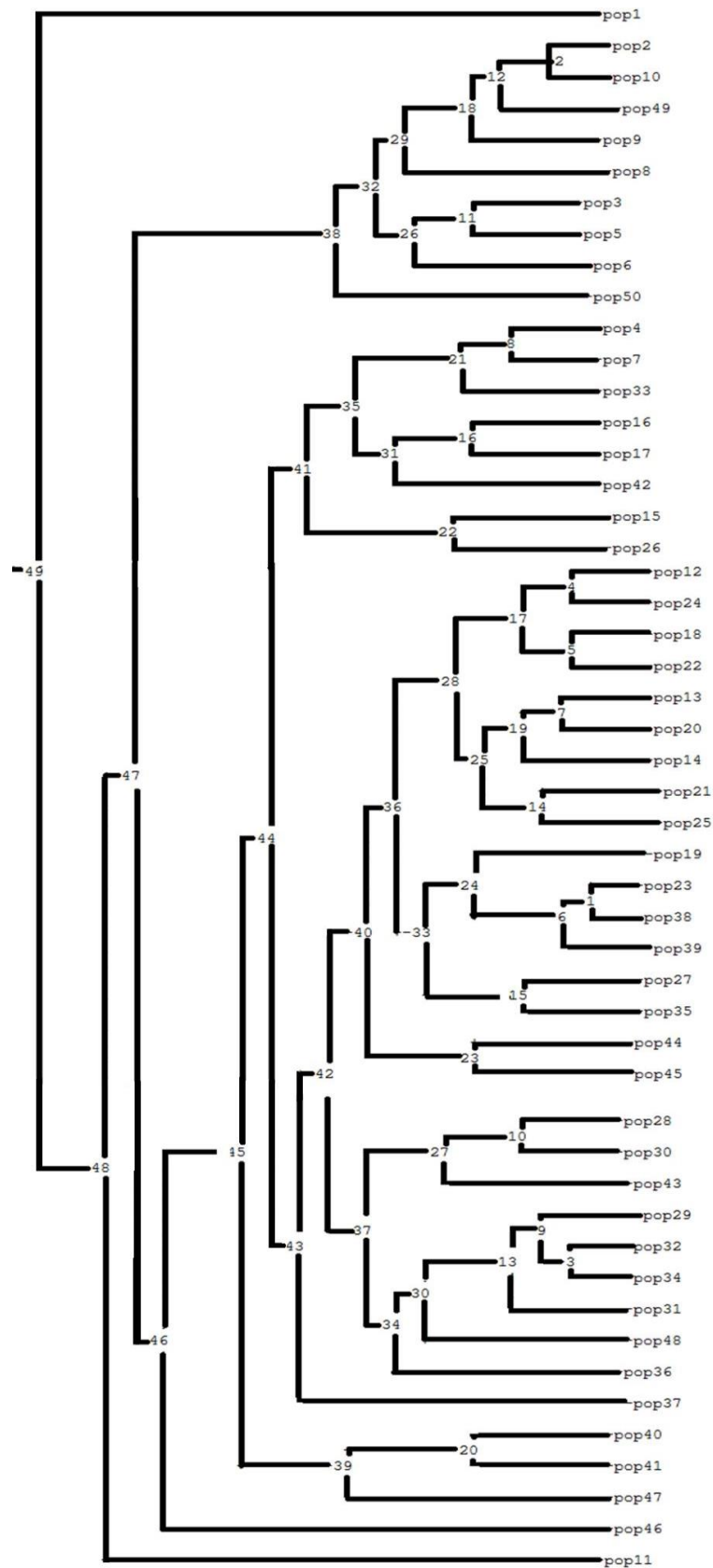


Figura 4: Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), entre as 50 populações de *Conyza sp.* O agrupamento foi realizado por meio do método UPGMA, empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al.,1999).

O primeiro grupo foi formado pelas populações 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 49 e 50 (Saldanha Marinho, Lagoa Vermelha, Campos Novos¹ e ², Curitiba¹ e ², Quilombo, Itaporã, e Itaquiraí). O grupo 2 foi formado com as populações 4, 7, 15, 16, 17, 26, 33 e 42 (Santo Ângelo, Abelardo Luz, Rancho Alegre D'Oeste, São João do Ivaí, Quinta do Sol, Francisco Alves, Londrina² e Santa Helena). O grupo 3 foi formado pelas populações 12, 18, 22 e 24 (Janiópolis, Alto Piquiri, Guaíra² e Palotina²). O grupo 4 foi formado pelas populações 13, 14, 20, 21 e 25 (Goioerê, Mariluz, Mal. Cândido Rondon, Guaíra¹ e Brasilândia do Sul), o grupo 5 foi formado pelas populações 19, 23, 38 e 39 (Toledo, Palotina¹, Mamborê² e Pato Branco). O grupo 6 foi formado pelas populações 27 e 35 (Maringá e Bela Vista do Paraíso), o grupo 7 foi formado pelas populações 44 e 45 (Assaí e Rolândia). O grupo 8 foi formado pelas populações 28, 30 e 43 (Céu Azul, Ouro Verde do Oeste² e Tamboara). O grupo 9 foi formado pelas populações 29, 31, 32, 34, 36 e 48 (Ouro Verde do Oeste¹, Lindoeste, Londrina¹, Sertãoópolis, Cambé e Caarapó) e o grupo 10 foi formado pelas populações 40, 41 e 47 (Cambira, Francisco Beltrão e Campos Novos Paulistas). As populações 1 (São José do Ouro), 11 (Campo Mourão), 37 (Mamborê¹) e 46 (Palmital) não formaram grupos e permaneceram como populações individuais.

O agrupamento das 50 populações de *Conyza* spp. de acordo com o modelo de análise Bayesiana está apresentado na Figura 5. Cada barra no gráfico representa uma planta e suas inferidas proporções de mistura alélica. As 11 diferentes cores representam os 11 grupos correspondendo à proporção diferencial de cada grupo de plantas. O valor ótimo de K determinado pela análise Bayesiana indicou que as 500 plantas de *Conyza* foram agrupadas em 11 subpopulações ($\Delta K_{11} = 8,362483$).

A análise do polimorfismo usando o *Structure* mostra que as maiores proporções de plantas nos cinco estados estão em grupos ancestrais diferentes. No estado do RS 36,3% e 31,2% das plantas estão nos grupos ancestrais IX e X, respectivamente. No estado de SC, 38,4% e 24,4% estão nos grupos IX e II. No estado de SP 73,2% das plantas estão no grupo III, e no estado de MS 56,6% das plantas e 31,2% estão nos grupos ancestrais II e V, respectivamente. No estado do PR onde foram coletadas populações de *Conyza* spp. em 35 localidades diferentes, proporções de plantas menores do que 15% (entre 10,8% a 14,5%) foram distribuídas nos grupos ancestrais I, IV, VI, VII, VIII e XI (Tabela 8). Desta forma, é possível observar que nos diferentes estados, bem como em diferentes áreas de um mesmo estado (PR), ocorre uma seleção diferencial de genótipos de *Conyza* spp. que foram organizados pela análise Bayesiana em grupos ancestrais diferentes.

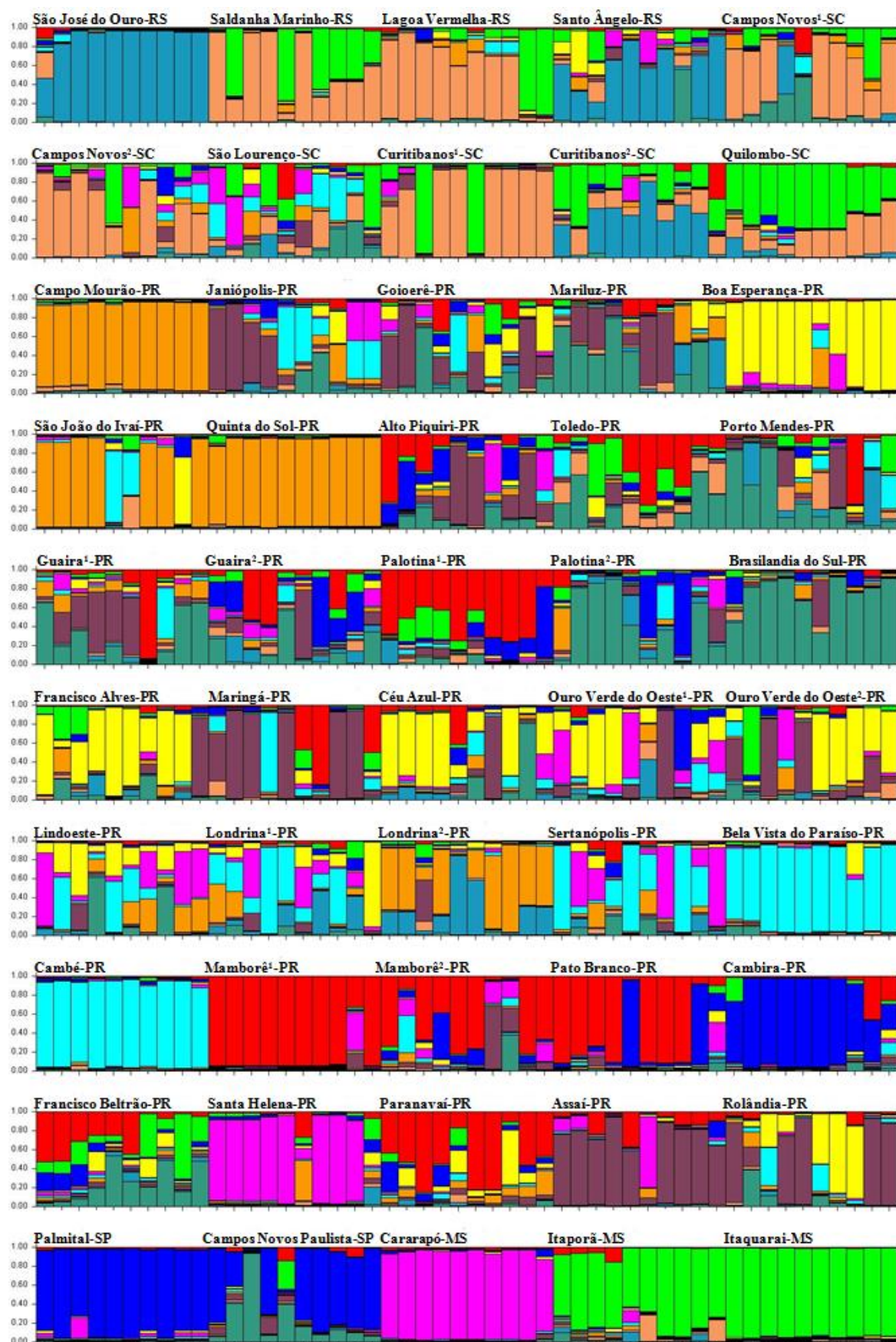


Figura 5: Gráfico de barra as 50 populações agrupadas em 11 grupos.

Tabela 8: Agrupamento das 50 populações de *Conyza* spp de acordo com o modelo de análise Bayesiana em 11 diferentes grupos.

Região/estado		Grupos										
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
1	São José do Ouro/RS	0.017	0.006	0.010	0.006	0.005	0.016	0.006	0.004	0.031	0.888	0.011
2	Saldanha Marinho/RS	0.010	0.355	0.006	0.007	0.005	0.008	0.016	0.006	0.576	0.005	0.007
3	Lagoa Vermelha/RS	0.014	0.215	0.015	0.021	0.009	0.034	0.053	0.010	0.598	0.010	0.020
4	Santo Angelo/RS	0.014	0.074	0.010	0.086	0.066	0.013	0.037	0.028	0.044	0.552	0.076
5	Campos Novos ¹ /SC	0.033	0.117	0.016	0.008	0.007	0.025	0.053	0.007	0.538	0.069	0.126
6	Campos Novos ² /SC	0.008	0.102	0.043	0.025	0.086	0.057	0.074	0.046	0.527	0.016	0.016
7	São Lourenço/SC	0.052	0.184	0.025	0.037	0.138	0.169	0.054	0.055	0.124	0.050	0.113
8	Curitibanos ¹ /SC	0.005	0.214	0.005	0.006	0.029	0.009	0.013	0.028	0.681	0.005	0.006
9	Curitibanos ² /SC	0.055	0.285	0.014	0.010	0.030	0.011	0.014	0.008	0.155	0.404	0.014
10	Quilombo/SC	0.016	0.563	0.024	0.013	0.009	0.014	0.012	0.006	0.284	0.051	0.009
11	Campo Mourão/PR	0.006	0.012	0.006	0.008	0.005	0.008	0.893	0.012	0.023	0.003	0.024
12	Jardiópolis/PR	0.022	0.011	0.039	0.052	0.100	0.237	0.081	0.316	0.025	0.024	0.092
13	Goiuere/PR	0.077	0.052	0.047	0.146	0.045	0.082	0.053	0.314	0.019	0.019	0.147
14	Mariluz/PR	0.048	0.016	0.010	0.052	0.011	0.023	0.081	0.259	0.031	0.095	0.373
15	Boa Esperança/PR	0.012	0.005	0.007	0.785	0.075	0.030	0.050	0.009	0.004	0.011	0.011
16	São João do Ivaí/PR	0.008	0.023	0.030	0.086	0.022	0.133	0.636	0.007	0.038	0.008	0.009
17	Quinta do Sol/PR	0.006	0.016	0.006	0.007	0.006	0.006	0.921	0.005	0.008	0.012	0.007

18	Alto do Piquiri/PR	0.165	0.032	0.185	0.025	0.097	0.027	0.041	0.301	0.014	0.015	0.098
19	Toledo/PR	0.257	0.164	0.031	0.038	0.006	0.047	0.011	0.054	0.152	0.008	0.230
20	Porto Mendes/PR	0.100	0.070	0.025	0.041	0.012	0.089	0.024	0.125	0.078	0.130	0.307
21	Guaira ¹ /PR	0.136	0.021	0.010	0.033	0.040	0.074	0.093	0.259	0.019	0.024	0.292
22	Guaira ² /PR	0.172	0.064	0.216	0.021	0.068	0.035	0.023	0.124	0.041	0.079	0.157
23	Palotina ¹ /PR	0.552	0.113	0.151	0.018	0.017	0.021	0.007	0.034	0.025	0.029	0.034
24	Palotina ² /PR	0.028	0.031	0.184	0.016	0.048	0.057	0.061	0.062	0.009	0.071	0.433
25	Brasilândia do Sul/PR	0.015	0.013	0.057	0.015	0.007	0.017	0.037	0.063	0.020	0.009	0.747
26	Francisco Alves/PR	0.023	0.081	0.026	0.562	0.013	0.011	0.048	0.106	0.014	0.045	0.072
27	Maringá/PR	0.187	0.049	0.024	0.025	0.016	0.129	0.008	0.517	0.027	0.004	0.014
28	Céu Azul/PR	0.068	0.012	0.035	0.459	0.043	0.062	0.032	0.113	0.010	0.046	0.120
29	Ouro Verde do Oeste ¹ /PR	0.026	0.015	0.105	0.315	0.193	0.075	0.026	0.135	0.032	0.059	0.021
30	Ouro Verde do Oeste ² /PR	0.021	0.089	0.028	0.364	0.069	0.033	0.038	0.268	0.033	0.020	0.037
31	Lindoeste/PR	0.015	0.006	0.012	0.205	0.249	0.171	0.142	0.040	0.010	0.021	0.130
32	Londrina ¹ /PR	0.027	0.032	0.029	0.159	0.139	0.317	0.084	0.037	0.009	0.125	0.042
33	Londrina ² /PR	0.010	0.027	0.014	0.025	0.012	0.016	0.537	0.051	0.018	0.274	0.018
34	Sertanópolis/PR	0.043	0.010	0.028	0.039	0.277	0.393	0.073	0.022	0.016	0.040	0.060
35	Bela Vista do Paraíso/PR	0.016	0.011	0.006	0.045	0.018	0.836	0.009	0.012	0.015	0.005	0.027
36	Cambé/PR	0.010	0.010	0.019	0.007	0.014	0.893	0.011	0.008	0.011	0.008	0.009

37	Mambore ¹ /PR	0.876	0.007	0.006	0.008	0.047	0.008	0.008	0.021	0.006	0.007	0.006
38	Mambore ² /PR	0.503	0.012	0.106	0.020	0.094	0.063	0.020	0.117	0.012	0.007	0.047
39	Pato Branco/PR	0.630	0.014	0.217	0.024	0.041	0.015	0.006	0.018	0.009	0.008	0.018
40	Cambira/PR	0.082	0.037	0.764	0.017	0.013	0.022	0.007	0.020	0.006	0.008	0.023
41	Francisco Beltrão/PR	0.243	0.219	0.087	0.073	0.020	0.020	0.024	0.026	0.007	0.026	0.254
42	Santa Helena/PR	0.042	0.043	0.035	0.023	0.722	0.013	0.060	0.014	0.011	0.025	0.011
43	Paranavaí/PR	0.529	0.039	0.090	0.132	0.013	0.026	0.081	0.035	0.035	0.035	0.022
44	Assaí/PR	0.109	0.005	0.023	0.013	0.115	0.012	0.016	0.685	0.006	0.005	0.013
45	Rolândia/PR	0.031	0.004	0.007	0.281	0.012	0.090	0.032	0.450	0.010	0.009	0.073
46	Palmital/SP	0.014	0.007	0.877	0.014	0.043	0.015	0.007	0.005	0.006	0.009	0.004
47	Campos Novos Paulista/SP	0.035	0.035	0.587	0.007	0.010	0.007	0.010	0.046	0.010	0.009	0.010
48	Cararapó/MS	0.014	0.004	0.018	0.011	0.911	0.010	0.004	0.012	0.003	0.004	0.007
49	Itaporã/MS	0.038	0.764	0.010	0.013	0.019	0.013	0.016	0.010	0.065	0.028	0.022
50	Itaquaraí/MS	0.006	0.932	0.007	0.010	0.006	0.005	0.006	0.004	0.009	0.007	0.007

As quatro populações coletadas no Rio Grande do Sul (1, 2, 3 e 4) apresentaram maiores proporções de plantas nos grupos IX e X. As plantas coletadas em São José do Ouro foram agrupadas 88,80% no grupo 10, 57,60% das plantas de Saldanha Marinho estão no grupo 9, 59,80% das plantas de Lagoa Vermelha estão no grupo 9 e 55,20% das plantas de Santo Ângelo estão no grupo 10, 36,37% das plantas deste estado estão agrupadas no grupo 10, 31,22% estão no grupo 9 e 16,25% das plantas estão no grupo 2, as demais plantas (16,16%) estão distribuídas nos demais grupos. As seis populações coletadas em Santa Catarina estão distribuídas preferencialmente nos grupos 2, 9 e 10. A maior parte das plantas (38,48%) está no grupo 9; 24,41% das plantas encontra-se no grupo 2. A amostra coletada em

Abelardo Luz apresentou uma grande diversidade de plantas, sendo que a maior porcentagem destas (18,40%) foi encontrada no grupo 2, 16,90% destas plantas foram encontradas no grupo 6, a menor proporção destas plantas (2,5%) foi encontrada no grupo 3.

Em determinados locais no estado do PR, pode ser verificado que mais de 50% dos genótipos (entre 50,7% a 92,1%) está num determinado grupo, enquanto em outros locais ocorre uma distribuição de plantas relativamente menor do que 50% nos 11 grupos identificados, indicando a ocorrência de mistura de genótipos e consequentemente, de maior variabilidade genética local (Janiópolis, Goioerê, Mariluz, Alto Piquiri, Toledo, Mal. Cândido Rondon, Guaíra, Palotina, Céu Azul, Ouro Verde do Oeste, Lindoeste, Londrina, Sertãoópolis, Francisco Beltrão, e Rolândia). A evidência de plantas com genoma de grupos ancestrais diferentes em algumas localidades (Figura 4) ilustra a maior variabilidade genética nestas populações e sugere a ocorrência de uma hibridação entre genótipos de grupos ancestrais diferentes, ou de uma menor pressão de seleção de plantas de um ou dois grupos ancestrais. Em apenas 51% dos acessos coletados no Paraná (Campo Mourão, Boa Esperança, São João do Ivaí, Quinta do Sol, Palotina¹, Brasilândia do Sul, Francisco Alves, Maringá, Londrina², Bela Vista do Paraíso, Cambé, Mambore¹, Mambore², Pato Branco, Cambira, Santa Helena, Paranavaí, e Assaí), foi verificado maiores proporções de plantas em um dos 11 grupos ancestrais, sugestivo de ausência de hibridização ou de um processo de seleção artificial de plantas de grupos ancestrais específicos. Considerando a hipótese de processos de seleção de genomas ancestrais, estes foram marcantes (mais de 75% das plantas) nas populações de Campo Mourão, Boa Esperança, Quinta do Sol, Bela Vista do Paraíso, Cambé, Mambore¹, e Cambira (Tabel 8; Figura 4). As 35 populações de *Conyza* spp coletadas no estado do Paraná são altamente estruturadas e apresentaram uma alta divergência genética evidenciada pelo elevado valor de F_{ST} (0,3741).

As duas populações coletadas no estado de São Paulo estão distribuídas em maior proporção no grupo 3 com 87,70% e 58,70%. As três populações coletadas no Mato Grosso do Sul estão distribuídas nos grupos 2 e 5; 91,10% das plantas analisadas de Caarapó apresentam genoma ancestral do grupo 5. As plantas de Itaporã estão agrupadas 76,40% no grupo 2 e 93,20% das plantas de Itaquiraí também estão presentes neste mesmo grupo.

Portanto as plantas coletadas em 50 áreas foram organizadas em 11 grupos ancestrais altamente diferenciados (Tabela 9), os grupos II e IX apresentaram o menor valor de divergência genética (0,1167), enquanto os grupos VIII e X foram os mais divergentes (0,4495).

Tabela 9: Divergência genética entre os 11 grupos ancestrais de *Conyza* spp.

Grupos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
I	-	0,2628	0,1487	0,1651	0,2039	0,1804	0,3209	0,1967	0,3236	0,3662	0,2133
II		-	0,2174	0,2809	0,336	0,2678	0,2769	0,3439	0,1167	0,2886	0,2738
III			-	0,239	0,2283	0,178	0,2993	0,2087	0,3123	0,3626	0,2178
IV				-	0,1835	0,1858	0,2007	0,2372	0,325	0,2432	0,2169
V					-	0,1565	0,2731	0,1805	0,3519	0,3792	0,2793
VI						-	0,1942	0,1937	0,1937	0,3412	0,1521
VII							-	0,2832	0,2167	0,2641	0,1449
VIII								-	0,3345	0,4495	0,1709
IX									-	0,3355	0,2638
X										-	0,2878
XI											-

A análise do polimorfismo nos 10 locos microssatélites foi importante para evidenciar o panorama genético de populações de *Conyza* spp. que infestam áreas de plantio nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul. A análise mostrou que as 500 amostras de *Conyza* spp. formam subpopulações geneticamente estruturadas.

O panorama genético para as plantas de *Conyza* spp. coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, bem como em 35 regiões dentro do estado do Paraná é de populações com alta divergência genética tanto entre elas como também dentro das populações. Esta é uma descrição que pode ter interesse prático porque populações geneticamente divergentes podem responder de forma diferenciada aos mesmos mecanismos de controle. A alta variabilidade genética dentro e entre populações de espécies de *Conyza* spp deve ser um dos fatores que limitam o seu controle.

4. Referências

- ABERCROMBIE, LG.; ANDERSON, CM.; BALDWIN, BG.; BANG, IC.; et al. (2009) Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1375-1429.
- BARROSO, GM.; PEIXOTO, AL.; COSTA, CG.; ICHASO, CLF.; GUIMARÃES, EF. & LIMA, HC. (1991). *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Brasil.
- BREMER, K. (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics*. **10**, 295-304.
- BUHLER, DD & OWEN, MDK. (1997) Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* **45**, 98–101.
- CARNEIRO, P. L. S.; MALHADO, C. H. M.; EUCLYDES, R. F.; CARNEIRO, A. P. S.; CUNHA, E. E. (2007) Endogamia, fixação de alelos e limite de seleção em populações selecionadas por métodos tradicionais e associados a marcadores moleculares. R. Bras. Zootec. **36**,369-375.
- CARNEIRO, P.L.S.; MALHADO, C.H.M.M.; EUCLYDES, R.F. et al. (2006) Oscilação genética em populações submetidas a métodos de seleção tradicionais e associados a marcadores moleculares. Rev. Bras. Zootec. **35**. 84-91. 2006.
- CARVALHO, A. Z. (2007) *Transferabilidade de microsatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose*. Dissertação (Mestrado). Pelota: UFP, 2007. 51p. - Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- CASE, CN. & CRAWLEY, MJ. (2000) Effect of interspecific competition and herbivory on the recruitment of an invasive alien plant: *Conyza sumatrensis*. *Biological Invasions* **2**, 103-110.
- CHRISTOFFOLETI, P.J ; OVEJERO, RFL.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S., JP.; CAETANO, AC.; CARVALHO, JC. & MOREIRA, MS.(2008). *Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas*. (3) Piracicaba: ESALQ. Brasil.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. (2006) Herbicidas alternativos para o controle de biótipos de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) supostamente resistentes ao herbicida glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2006, 25, Brasília. **Resumos...** Londrina: **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**.
- CIRCUNVIS, BC.; RENESTO, E.; MANGOLIN, CA.; MACHADO, MFPS. & TAKASUSUKI, MCCR. (2014) Caracterização genética de amostras de *Conyza* sp. do estado do Paraná. *Planta Daninha*. **32**, 173-179.
- CULLING, K.W. (1992) Desing and testing of a plant-specific PCR *primer* for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* **1**, 233-240.

DAUER, J. & MORTENSEN, D. (2005) *Management implications of long-distance wind dispersal of Conyza canadensis*. *Proceedings of the 13th EWRS Symposium*. Bari, Italy: European Weed Research Society.

DAUER, JT.; MORTENSEN, DA. & VANGESSEL, MJ. (2007) Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *Journal of Applied Ecology* **44**, 105-114.

DAUER, JT; MORTENSEN, EC; LUSCHEI, SA; ISARD, E; SHIELDS, MJ & VANGESSEL, MJ. (2009) *Conyza canadensis* seed ascent in the lower atmosphere. *Agricultural and Forest Meteorology* **149**, 526-534.

DOYLE J J & DOYLE J L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.

DAVIS, VM.; KRUGER, GR.; STACHLER, JM.; LOUX, MM. & JOHNSON, WG. (2009). Growth and seed production of horseweed (*Conyza canadensis*) populations resistant to glyphosate, ALS-inhibiting, and multiple (glyphosate + ALS-Inhibiting) herbicides. *Weed Science* **57**, 494-504.

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

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

EARL, DA. & VON, HBM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7, 2009.

GOLDBLATT, P. (1985) Index to plant chromosome numbers: 1982-1983. Monographs in Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden, **13**, p. 1-224.

GOLDSTEIN, D.B. & SCHLOTTERER, C. (1998). *Microsatellites evolution and application*. Oxford University Press, New York.

GOUDET J (2002) FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3.2). Available at: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (last accessed 21 Juny 2015).

GOULART, ICGR.; MEROTTO JUNIOR, A.; NUNES, AL. & BERED, F. (2011) Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. *Planta Daninha*, **29**, 1175-1181.

HEAP, I. The international survey of herbicide resistant weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>, consultado em: 18/06/2015, 2015.

HOLM, L.; DOLL, J.; HOLM, E.; PANCHO, J. & HERBERGER, J. World weeds: Natural histories and distribution. **John Wiley & Sons Inc.** p. 226–235, 1997.

KISSMAN, K.G. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2015. Disponível em: http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto_resistencia_herbicidas.doc . Acesso em 13 de Maio de 2015.

KISSMANN, K. G. & GROTH, D. (1999) *Plantas infestantes e nocivas*. (2). São Bernardo do Campo: Basf.

LORENZI, H. (2000). *Manual de identificação e controle de plantas daninhas: Plantio direto e convencional*. (5) Nova Odessa: Plantarum.

MONTEZUMA, M. C. et al. Avaliação da suspeita de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25, 2006. Brasília. **Resumos...** Londrina: **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; GALLI, A.J.; MONTEZUMA, M.C.; MAROCHI, A.I.; CARVALHO, S.J.P. & CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de buva (*Conyza canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros do estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25. Brasília, 2006. **Resumos Expandidos**. Brasília: SBCPD, 2006. (CD-ROM).

NAKAJIMA, N.J. & SEMIR, J. (2001) Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **24**, 471-478, 2001.

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

NEI M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. *Genetics* **89**, 538–590.

NOYES, R.D. (2000) Biogeographical and evolutionary insights on *Erigeron* and allies 799 (*Asteraceae*) from ITS sequence data. *Plant Systematics and Evolution*. **220**, 93-114.

OKADA, M.; BRADLEY, DH.; KURT JH.; YANHUI P.; SHRESTHA, A.; STEWART JR, CH.; STEVEN DW. & JASIENIUUK, M. (2013) Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* in California. *Evolutionary Applications*. **6**, 761-777.

OKADA, M.; BRADLEY, DH.; KURT J H.; YANHUI P.; SHRESTHA, A.; STEWART JR, CH.; STEVEN DW. & JASIENIUUK, M. (2015) Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* in California and a comparison with closely *Conyza Canadensis*. *Weed Research*. **55**, 173-184.

PEAKALL R; SMOUSE PE. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, **6**, 288-295.

PITELLI, RA. (1985) Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. *Informe Agropecuário* **11**, 16-27

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

PRUSKI, JF. & SANCHO, G. (2006) *Conyza sumatrensis* var. *leiotheca* (Compositae: Astereae), a new combination for a common neotropical weed. *Novon* **16**, 96-10.

RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; TORO, M. A. & FERNÁNDEZ, J. (2009) Assessing population genetic structure via the maximisation of genetic distance. *Genetics Selection Evolution* **41**, 49.

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

SANTOS, G.; OLIVEIRA JR, RS.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, CA.; MACHADO, MFPS.; MANGOLIN, CA. & NAKAJIMA, JN. (2014) *Conyza sumatrensis*: A new weed species resistant to glyphosate in the Americas. *Weed Biology and Management*, **14**, 106-114.

SOARES, AA. ; FREGONEZI, AMDT. ; BASSI, D. ; MANGOLIN, CA.; COLLET, SAO. ; OLIVEIRA JUNIOR, RS. & MACHADO, MFPS. (2015). Evidence of High Gene Flow Between Samples of *Conyza canadensis* and *C. bonariensis* as Revealed by Isozyme Polymorphisms. *Weed Scienc. In prelo*.

THEBAUD, C. & ABBOTT, RJ. (1995). Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *American Journal of Botany* **3**, 360-368.

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.

USDA - United States Department of Agriculture. (1970) Selected weeds of the United States. Washington: Agriculture Research Service, Agriculture Handbook **366**, 463.

VARGAS, L.; BIANCHI, MA.; RIZZARDI, MA.; AGOSTINETTO, D & DAL MAGRO, T. (2007). Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. *Planta Daninha* **3**, 573-578.

WEAVER, SE. (2001) The biology of Canadian weeds. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science* **81**, 867–875.

WRIGHT S. (1978) Variability within and among populations. Chicago: University of Chicago Press, 580.

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

ANEXOS

Author Guidelines

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: [Colour Work Agreement Form](#), [Word Document Template](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [OnlineOpen](#), [Funder Policies](#), [Articles published in Weed Research](#), [Author Services](#), [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. The aim is to publish the best weed science from around the globe and to be the journal of choice for weed science researchers. It is the official journal of the [European Weed Research Society](#). Papers are taken that focus 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. Weed Research has adopted specific editorial policies for research on allelopathy, herbicide resistance and species occurrence modelling. The journal will only take papers that investigate allelopathy under field-like conditions. Cases of herbicide resistance should be novel and demonstrate clear conceptual advances in the field of resistance research. Cataloguing cases of resistance in species with a known propensity for resistance evolution with resistance-prone herbicides, whilst important for informing local weed management decisions, is not sufficiently novel for publication. Likewise, predictions of the effect of climate change on species distributions should go beyond output from simple models. 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. 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.

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 [Wiley Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

The Weed Research adheres to the ethical guidelines below 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 in the Acknowledgements section, prior to the References.

If the author does not include a conflict of interest statement in the manuscript then the following statement may 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 copyright 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 assigns 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.

For questions concerning copyright, please visit [Copyright FAQs](#)

2.8. Copyright Transfer Agreement

Authors will be required to assign copyright to the European Weed Research Society. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. Government employees in both the US and the UK need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned. For multi-author papers, it is the responsibility of the corresponding author to submit a signed CTA, on behalf of all contributors. Production will not start on your paper until we are in receipt of a signed copyright transfer agreement.

2.9. OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

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).

For those using Word, a document template is provided [here](#).

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.

For those using Word, a document template is provided [here](#).

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 and Summary with line numbers under the file designation 'main document'
- Figure files under the file designation 'figures'
- The Acknowledgements and any Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded within your main manuscript

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, so please include all these details in the 'main document'. 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. [Our average time to first decision is 72 days.](#) 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 ScholarOne Manuscripts (formerly known as 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. We suggest a maximum of 35 references.

Methods papers: We encourage the submission of methods papers and should be prepared as original research articles. These should evaluate new techniques against existing methods, where possible, so that any advantages or disadvantages are clear.

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 up to 2500 words in total 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 UK English. Authors for whom English is a second language should consider having their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission, to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.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. Do not start a sentence with an abbreviation.

Scientific Names:

Weed names Latin 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, but *Stellaria media* starting a sentence. 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. A Word template is available ([see links above](#)).

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 230 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 and Methods papers

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 objective in writing the Methods is that there is sufficient information presented for a reader to be able to repeat the work.

Statistics: The Methods should include full details of the statistical techniques used and authors are advised to refer to the article 'Current statistical issues in Weed Research' *Weed Research* **50**, 5-24. Onofri A, Carbonell EA, Piepho H-P, Mortimer AM & Cousens Rd (2010). We anticipate that authors, wherever possible, fully discuss the analysis of their results with statisticians within their own institutions. All estimated values (e.g. model parameters, means, differences etc.) should be presented together with an appropriate measure of variability in text, tables and graphs. We require the presentation of standard errors of differences between means with appropriate degrees of freedom where possible; authors may also include least significant differences or other measures of variability in tables, etc. Standard errors, etc., should be given to one more decimal place than the means to which they apply. Please only use multiple comparison procedures where appropriate, as these may create a 'multiplicity problem', because the number of statistical tests increases progressively as the number of means to be compared increases (see Onofri et al. (2010) for further discussion).

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 2500 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 & 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 & AUTHOR BC (1989) Title of article with lower-case initials to all words. *Journal Title in Italics in Full Volume No. in bold*, 123-129.

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

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

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

AUTHOR A (1992) Title of article. In: *Proceedings 1991 Title of Conference in italics* (ed AB Editor)(20-22 November, Location City, Country). 158-165. Publisher Location, City, Country.

AUTHOR A (2005) Online database title or webpage title. Available at: <http://www.webaddress> (last accessed day month year).

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, Figure Legends and Supporting Information

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 in the text.

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, PDF or Excel files (for line art figures); TIFF files (for halftone/photographs figures) only. MS PowerPoint and Word Graphics are also suitable 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 Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.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 Wiley 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, Wiley Blackwell require you to complete and return a [Colour Work Agreement Form](#) before your paper can be published. Please post or courier all pages of your completed form to Customer Services (OPI). Note that electronic or faxed copies cannot be accepted. The address for mail is as follows: Customer Services (OPI), John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre, New Era Estate, Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex, PO22 9NQ

Any article received by Wiley Blackwell 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](#).

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

Supporting information: Supporting Information can be a useful way for an author to include important but

ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files.

Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format.

The journal will take limited supporting information in print within the 6000 word limit as appendices. We will also take online-only supporting information, where the information is directly linked to and important for understanding the paper. This can be in the form of any electronic data, ranging from appendices, tables, figures, to photographs and computer code. These are stored online with the published version of the paper on Wiley Online Library. We can provide an online link to webdata hosted elsewhere, but as these links often cannot be guaranteed in perpetuity, we do not favour these. We do not provide a repository for base research data, as this ought to be provided by researchers' organisations.

For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

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.

At the same time, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and

Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

6.1. Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to download their proof as a PDF(portable document format). Corrections must be returned to the Author Corrections Team (bp corrections@sps.co.in) within 3 days of receipt.

6.2. Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

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: http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG

If you have queries about paper offprints please email offprint@cosprinters.com

6.3. Author Services

For more substantial information on the services provided for authors, please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/>

6.4. Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406074.html>.

6.5. Early View

Weed Research is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. For more information on DOI, click [here](#).

Last updated: 14 October 2014