

## CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE BIÓTIPOS DE *Conyza* spp.

Maria Helena Faustinoni Bruno <sup>1\*</sup>, Fernanda Castanho Machado <sup>2</sup>, Cleber Gabriel Matyak <sup>3</sup>, Laís de Araújo <sup>1</sup>, Sandremir Carvalho <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bióloga, Universidade Estadual do Norte do Paraná - Campus Luiz Meneghel, Rodovia BR-369 Km 54, Vila Maria, CP 261 - CEP 86360-000, Bandeirantes - Paraná – Brasil;

<sup>2</sup> Doutoranda, Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445, Km 380 - Campus Universitário, Londrina - PR, 86057-970.

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, Universidade Estadual do Norte do Paraná - Campus Luiz Meneghel, Rodovia BR-369 Km 54, Vila Maria, CP 261 - CEP 86360-000, Bandeirantes - Paraná – Brasil;

<sup>4</sup> Professor Doutor, Universidade Estadual do Norte do Paraná - Campus Luiz Meneghel, Rodovia BR-369 Km 54, Vila Maria, CP 261 - CEP 86360-000, Bandeirantes - Paraná – Brasil.

\*Autor para correspondência: mhelenafb@hotmail.com

**RESUMO:** As plantas daninhas são causa do encarecimento das lavouras, entre elas está *Conyza* spp, conhecida como buva. Marcadores moleculares vem sendo utilizados para complementar sua caracterização. A técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é adaptada para diversas análises genéticas, fornecendo alta cobertura do genoma. Com objetivo de caracterizar molecularmente morfotipos de buva, foram coletadas 60 plantas da UENP – Bandeirantes/PR. A análise molecular com AFLP seguiu etapas de digestão, ligação de adaptadores, amplificação pré-seletiva e seletiva, utilizando combinação de seis pares de *primers* AFLP. Os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida 8% e corados com AgNO<sub>3</sub>. Dos 218 *loci*, 97 foram polimórficos sendo 53 específicos para um morfotipo e 44 para o outro. A matriz de distância genética, a porcentagem de locos polimórficos, diversidade gênica de Nei (1978), e a distância genética foram obtidas utilizando o programa TFPGA (*Tools For Population Genetics Analyses*). Os resultados da AMOVA mostram que a variação entre as populações é de 85,18% e dentro das populações é de 14,82% indicando que os morfotipos sejam espécies diferentes. Através das análises moleculares e principais características morfológicas demonstrou se que os morfotipos são espécies distintas, o morfotipo A é *Conyza sumatrensis* e o morfotipo B *Conyza bonariensis*.

**PALAVRAS CHAVE:** AFLP. Buva. Diversidade. Genética. Polimorfismo.

## MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BIOTYPES OF *Conyza* spp.

**ABSTRACT:** Weeds are cause of expensive management of the crops, between them is *Conyza* spp., known as Buva. Moleculars Marks is being used for complement its characterization. The AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technique is suited for differents genetic analyses, providing a tall genome coverage. With object of Molecularly characterize morphotypes of buva were colleted 60 plants of UENP – Bandeirantes/PR. The molecular analyze AFLP followed phases of digestion, adapter binding, pre-selective amplification and selective amplification using a combination of six pairs of AFLP primers. The fragments were separated in 8% polyacrylamide gel and colors with AgNO<sub>3</sub>. Of the 218 *loci*, 97 were polymorphics for one morphotype e 44 for the other. The matrix genetic distance, the porcentage of polymorphics loci, Nei gene diversity (1978) and the genetic distance were obtained using the TFPGA (Tools For Population Genetics Analyses) program. The AMOVA results show that variation between the populations is 85,18% e inside of the populations is 14,82% indicating that morphotypes are diferentts species. Across of the moleculars analyses and main morphological characteristics show that morphotypes are distints species, o morphotype A is *Conyza sumatrensis* and morphotype B is *Conyza bonariensis*.

**KEY WORDS:** AFLP. Buva. Diversity. Genetic. Polymorphism.

## INTRODUÇÃO

Na agricultura, as plantas daninhas são lavouras, pois competem de forma direta por recursos uma das causas que mais encarecem o manejo das essenciais para o desenvolvimento das culturas como

água, luz, espaço para crescimento e de forma indireta porque podem liberar substâncias alelopáticas ou hospedar fitopatógenos, podendo danificar a cultura (Timossi et al., 2018).

O gênero *Conyza*, conhecido popularmente como buva, pertencente à família Asteraceae, possui cerca de 50 espécies. Essas plantas daninhas se destacam por invadirem as mais diversas áreas, entre elas cultivadas, não cultivadas, pastagens e culturas forrageiras, seu ciclo inicia no outono/inverno e termina no verão (Trezzi et al., 2011; Santos et al., 2014).

As espécies de buva ganham destaque, pois possuem grande adaptabilidade, alta produção de sementes, capacidade de dispersão, autopolinização, diversidade de biótipos e as sementes não apresentam dormência (Santos et al., 2013). *Conyza bonariensis* é nativa da América do Sul e ocorre de forma abundante na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil. Neste último, sua presença é mais intensa nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. *Conyza sumatrensis* também é nativa da América do Sul, e tem relato frequentes de sua aparição no Rio Grande do Sul e Paraná, e *Conyza canadensis* é nativa da América do Norte (Lazaroto et al., 2008; Marochio et al., 2017).

O gênero *Conyza* possui espécies com alto grau de polimorfismo, que por vez dificulta sua identificação. O fato de *Conyza* estar distribuída por vários continentes mostra que é uma espécie com alta adaptabilidade - característica esta que depende diretamente da diversidade genética da espécie, além disso essas plantas apresentam plasticidade fenotípica, uma mudança na expressão fenotípica em resposta a fatores ambientais, que é considerada uma estratégia adotada pelas plantas daninhas para seu estabelecimento em diferentes ambientes (Paula et al., 2017).

A identificação correta dos diferentes biótipos de buva é o aspecto mais importante para garantir um controle e manejo adequado para prevenção da seleção de biótipos resistentes aos herbicidas (Santos et al., 2015).

A caracterização de biótipos é baseada em características morfológicas, sendo de grande importância, pois permite diferenciar espécies garantindo um controle mais preciso, porém tem como desvantagem a necessidade de que a planta realize todo seu ciclo de vida. O emprego de marcadores moleculares, tem permitido estudar a similaridade ou dissimilaridade genética dentro e entre populações,

espécies e biótipos vegetais, sendo complementar a caracterização morfológica (Busato et al., 2004; Rocha et al., 2009 Schneider et al., 2018).

Entre as técnicas moleculares, o AFLP se destaca pois é uma técnica multilocus com alto índice de detecção de variabilidade genética e com ampla cobertura do genoma e baixo custo. De maneira geral a técnica se resume na extração do DNA genômico da planta que depois é clivado por enzimas endonucleases de restrição, logo mais são aplicados adaptadores às extremidades desses fragmentos de restrição, que anelam com primers específicos, durante a PCR (pré-amplificação e amplificação seletiva). Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel de poliácridamida e visualizados por autoradiografia, corados com nitrato de prata ou fluorescência (Souza, 2015). O perfil de fragmentos é resultado de variações nos sítios de restrição das enzimas utilizadas, dentre suas principais vantagens é que não precisa se de informações genéticas prévias para construção primers (Frazon et al., 2009; Buttow et al., 2010), e por fim essas características da técnica AFLP a torna para a caracterização da variabilidade genética (Souza, 2015).

As características morfológicas, agrônômicas e moleculares de plantas são geralmente utilizadas nos estudos de variabilidade genética e identificação de espécies, diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar morfológica e molecularmente, por meio da técnica AFLP, biótipos de *Conyza* spp., também buscando a identificação e classificação de espécies, e de ferramentas que se mostram úteis e complementares.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e diferenciação de biótipos de *Conyza* spp.

Foram coletados e diferenciados, na fazenda escola da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, dois morfotipos do gênero *Conyza* e feito uma identificação prévia: o morfotipo "A" com margens das folhas finamente denticuladas e os ramos não ultrapassam o topo do caule e o morfotipo "B" com folhas de margens inteiras e ramos laterais que ultrapassam o ramo principal. Sendo coletado uma amostra de 30 plantas de cada morfotipo. Foi feito uma análise morfológica das plantas, considerando as características diferenciadoras do gênero caule,

folhas, nervuras, pilosidade, ramos e inflorescência (Suplementar 1). Folhas jovens dos morfotipos foram coletadas e levadas ao Laboratório de Biotecnologia

e Biologia da Conservação da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel para a realização de análises moleculares.

### Suplementar 1. Origem e características das espécies *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* e *Conyza sumatrensis*.

	<i>Conyza bonariensis</i>	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Conyza sumatrensis</i>
<b>Origem</b>	América do Sul	América do Norte	América do Sul
<b>Cor das folhas</b>	Verde acinzentado	Verde amarelado	Verde acinzentado
<b>Pilosidade</b>	Ausente	Folhas glabras, exceto as bordas da folha	Pilosa
<b>Pecíolo</b>	Pecíolo estreito e/ou ausente	Pecíolo estreito	Pecíolo mais amplo no meio
<b>Nervura</b>	Única nervura visível	Única nervura visível	Nervuras secundárias visíveis
<b>Formato das folhas</b>	Simples, alternas, sésseis, oblanceoladas ou lanceoladas	Isoladas, simples, sésseis, de formato-linear lanceoladas	As inferiores são oblanceoladas e quanto mais próximo ao ápice menor são as folhas
<b>Margens</b>	Não denteadas	Finamente denteadas	Inteiras ou com 1 a 4 dentes em cada margem
<b>Plumagem da margem das folhas</b>	Elevada densidade de pelos finos e longos	Coberta de pelos duros e espessos	Densa com pelos finos e longos dispersos por toda a margem
<b>Caule</b>	Muito piloso	Glabro ou com pelos	Muito piloso
<b>Pelos na haste</b>	Elevada densidade de pelos	Pouco a moderado	Elevada densidade de pelos
<b>Altura média (cm)</b>	100 a 200 cm	150 a 250 cm	100 a 200 cm
<b>Ramos</b>	Ramos laterais passam do ramo terminal	Ramos laterais não ou raramente passam do ramo terminal	Ramos laterais não passam do ramo terminal
<b>Ramificações</b>	Densidade baixa na base e alta no ápice	Intensa, apenas na parte superior	Ramifica-se na parte superior da haste principal
<b>Inflorescência</b>	Cacho de capítulos globulosos e pedunculados que se encontram na parte superior do caule e ramos, possuindo brácteas ao redor	Amplamente colunar, podendo ser ereta ou ± piramidal a losangular	Cacho de capítulos com forma claramente de losango
<b>Flores</b>	Raio amarelo esverdeado de flores, formato tubular	Raio branco de flores, ligulado, ligeiramente salientes	Raio creme de flores, em forma tubular
<b>Diâmetro</b>	≥ 10 mm	< 10 mm	< 10 mm
<b>Diâmetro e pelos das brácteas</b>	5-8 mm; densamente peluda	2-4 mm; glabra (sem pelos) ou quase isso	5-7 mm; densamente peluda

**Nota:** Adaptado de Lazaroto, Fleckii, Vida, (2008); Sansom, Saborido, Dubois, (2013); Santos, G., (2012); Lorenzi, H., (2016).

### Caracterização molecular

O DNA total foi extraído, a partir de cada amostra vegetal, segundo protocolo de Doyle; Doyle (1987). e testado quanto sua integridade, utilizando gel de agarose a 1% em corrida eletroforética. A quantificação foi feita por espectrofotometria utilizando espectrofotômetro UV/VIS. As amostras de DNA utilizadas para reação de digestão-ligação foram ajustadas para a concentração de 600 ng/μL.

As reações de digestão-ligação foram realizadas em um volume total de 30μL, sendo cada reação composta por duas enzimas de restrição: EcoRI (20U/μL) e MseI (10U/μL) (0,25 μL e 0,5 μL respectivamente) e 2μL de Tampão da MseI (Buffer 10x); 2 μL de tampão da T4 DNA ligase 10X; 1μL de NaCl 0,5M; 0,5μL de BSA 1mg/mL; 0,5 μL de DTT 5mM; 1μL de adaptadores MseI 50mM; 1μL de adaptadores EcoRI 5mM; 1μL

de T4 DNA Ligase 5U/μL completando-se o volume com H<sub>2</sub>O ultrapura. As condições de termociclagem consistiram em 60°C por 6 horas, 22°C por 2 horas e 70°C por 1 hora. Da reação de digestão-ligação, 5μL foram diluídos em 20μL de água ultrapura para o processo de amplificação pré-seletiva.

Para a amplificação pré-seletiva, foi utilizada uma reação contendo 4,5μL de GoTaq® Master Mix 2X; 0,58μL de primer pré-seletivo, com combinação Eco A (5' GAC TGC GTA CCA ATT CA 3') e Mse C (5' – GAT GAG TCC TGA GTA AC 3'); 2,92μL de água do mix e 2μL da reação de digestão-ligação diluída, cujo volume total foi de 10 μL e as condições de termociclagem consistiram em uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos e 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 segundo, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguindo de uma

extensão final a 60°C por 30 minutos, 5µL dessa reação foram diluídos em 45µL de água ultrapura para serem utilizados na amplificação seletiva.

Resumidamente, a amplificação seletiva insiste em 3,5µL GoTaq® Master Mix 2X, 0,54µL de primer seletivo EcoRI 1 µM; 0,54 µL primer seletivo MseI 5 µM; 2,92 µL de água do mix e 2,5 µL da amplificação pré-seletiva diluída foram misturados e submetidos a amplificação, a qual consistiu em 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; 8 ciclos de 94°C por 1 segundo, 64°C por 30 segundos (decrecendo 1°C em cada ciclo de 64°C a 57°C) e 72°C por 2 minutos; 23 ciclos de 94°C por 1 segundo, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 60°C por 30 minutos. Para esta foram realizados testes de combinações de diferentes pares de primers complementares aos adaptadores EcoRI e MseI com as mesmas condições de ciclagem citadas anteriormente, sendo os primers selecionados EcoRI e MseI, respectivamente, AC-GT, CA-CG, CG-CA, CG-CTT, GC-CG e GT-AC.

Finalmente, a separação dos fragmentos foi realizada em gel poliacrilamida a 8% (18g de acrilamida e 2g de Bis-acrilamida para 100mL de água destilada) a 200 volts por um período de 6 horas em eletroforese. Após a corrida eletroforética a coloração dos fragmentos foi realizada com nitrato de prata a 20%. Os géis foram analisados visualmente e os marcadores obtidos acessados para presença (1) ou ausência (0) de fragmentos, gerando uma matriz binária que foi

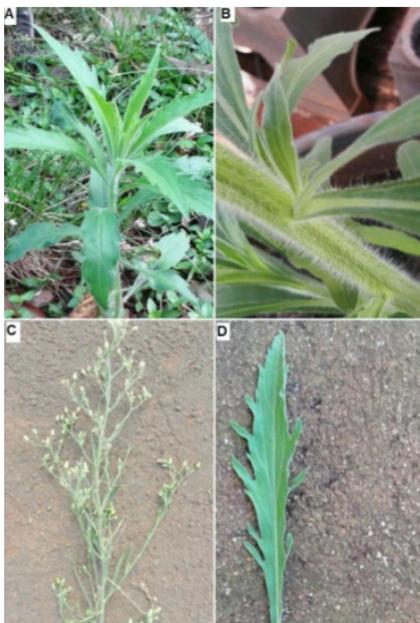
utilizada nas análises estatísticas. Para o cálculo do coeficiente de variação foi utilizado o programa dBoot ver. 1.1 (Coelho 2001). Para verificar a variabilidade genética total entre e dentro de populações, bem como o índice de fixação alélica (FST) utilizou-se a análise de variância molecular (AMOVA) conduzido no programa Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2005). A matriz de distância genética, a porcentagem de locos polimórficos, diversidade gênica de Nei (1978), e a distância genética foram obtidas utilizando o programa TFGA (Tools For Population Genetics Analyses) versão 1.3 (MILLER, 1997).

## RESULTADOS

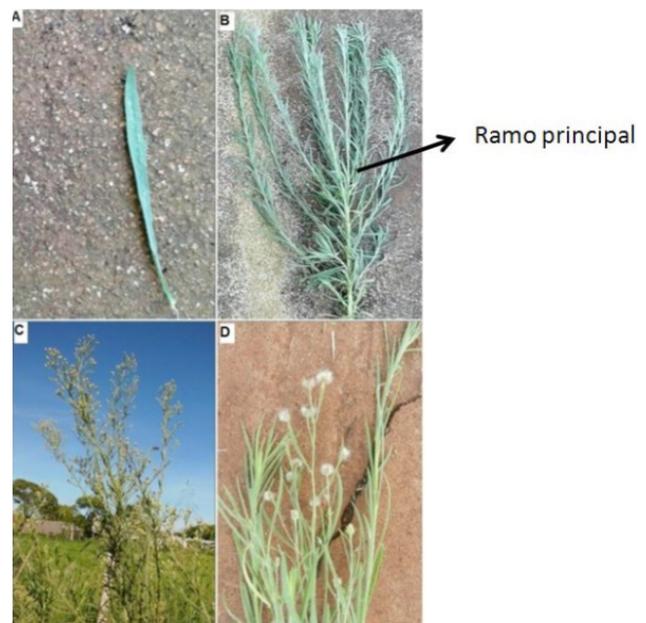
### Diferenciação de morfotipos de *Conyza* spp.

Na análise de características e estruturas morfológicas diferenciadoras do gênero, baseando-se no Suplementar1, as plantas mostraram divergências o que indica que sejam espécies diferentes. O morfotipo A (Figura 2) apresentou margem denteada, nervura secundária visível nas folhas e coloração verde acinzentada, inflorescência na parte superior, e essas características indicam que seja a espécie *Conyza sumatrensis*. Já no morfotipo B (Figura 3) destacam-se, também, as folhas de margens inteiras e presença de ramos laterais que ultrapassam o ramo principal e inflorescência na parte superior dos ramos e caules, estruturas presentes em *Conyza bonariensis* e que se propõe a ser essa espécie, sendo as duas já relatadas no Estado do Paraná.

**Figura 2** – Morfotipo “A”. A) Juvenil. B) Caule. C) Inflorescência. D) Folha.



**Figura 3** - Morfotipo “B”. A) Folha. B) Ramos secundários e principal. C e D) Inflorescência e sementes.



### Caracterização molecular

Um total de 218 loci foi amplificado, utilizando as seis combinações dos pares de primers, nas análises AFLP (Tabela 1), com uma média de 37 fragmentos

amplificados por par. Dos 218 loci amplificados, 97 foram polimórficos, sendo 53 específicos para o morfotipo A e 44 para o morfotipo B, ou seja, 44, 49% do total de loci amplificados foram polimórficos.

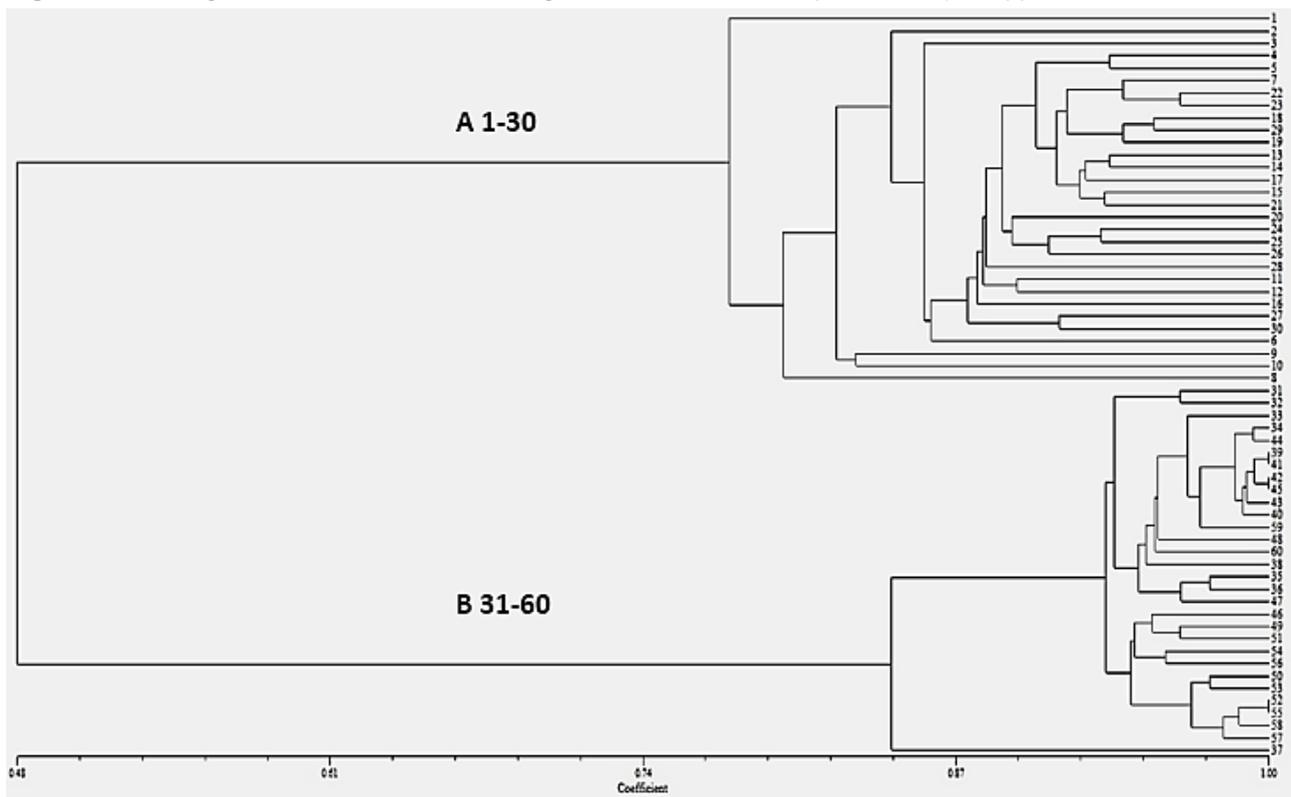
**Tabela 1.** Combinações de primers utilizados nas análises e número de fragmentos gerados por combinação.

Combinação de Primers	Número de fragmentos
EcoRI CA – CG Msel	46
EcoRI CG – CA Msel	22
EcoRI CG – CTT Msel	26
EcoRI GC – CG Msel	31
EcoRI GT – AC Msel	51
EcoRI AC – GT Msel	42
TOTAL	219

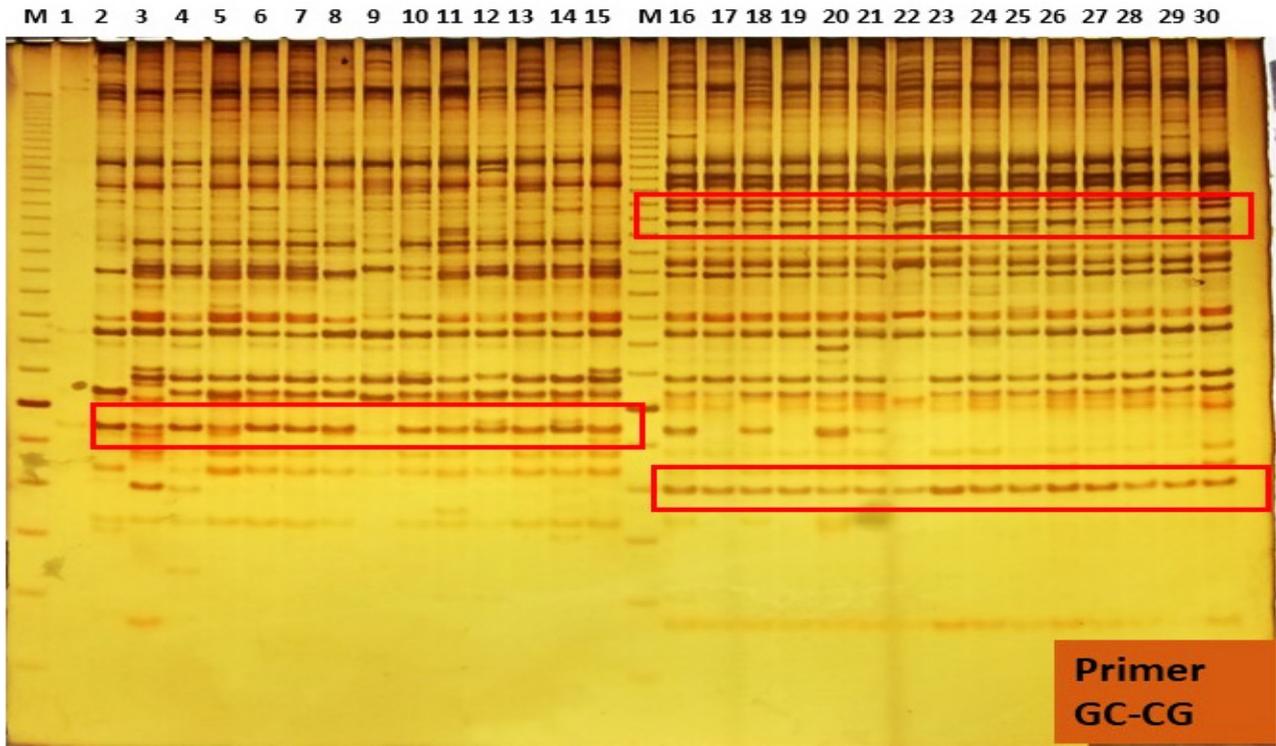
A combinação de primers EcoRI GT – AC Msel apresentou a maior taxa de amplificação, com um total de 51 fragmentos. O perfil eletroforético apresentado na figura 4, utilizando o primer EcoRI GC – Msel CG, com apenas 15 indivíduos de cada população, demonstra que os biótipos analisados possuem padrões de banda diferentes. Já a Figura 5 traz a amplificação do par de primer EcoRI CG – Msel CTT, com os 60 indivíduos do presente estudo, que A e B tem fragmentos específicos destacadas com os retângulos vermelhos.

Os resultados da AMOVA mostram que a variação molecular entre as populações é de 85,18% (tabela 2) e dentro das populações é de apenas 14,82%. O dendrograma das distâncias genéticas de Nei (1978) (Figura 6) ilustra a alta variabilidade existente entre os biótipos, corroborando com o resultado da AMOVA. O primeiro grupo é o biótipo A, com a espécie *Conyza sumatrensis* e o segundo grupo, biótipo B, com *Conyza bonariensis*. Essas ferramentas são uma contribuição importante para avaliações taxonômicas, associadas a estudos morfológicos sobre identificação de espécies (Rocha et al., 2009).

**Figura 4.** Dendrograma mostrando a distância genética entre os 2 biótipos de *Conyza* spp.



**Figura 5.** Perfil eletroforético dos biótipos estudados, com os fragmentos resultantes da amplificação com o par de primer EcoRI GC – MseI CG. 1-15 plantas do biótipo A e 16-30 plantas do biótipo B, a letra M= Marcador 100 pb.

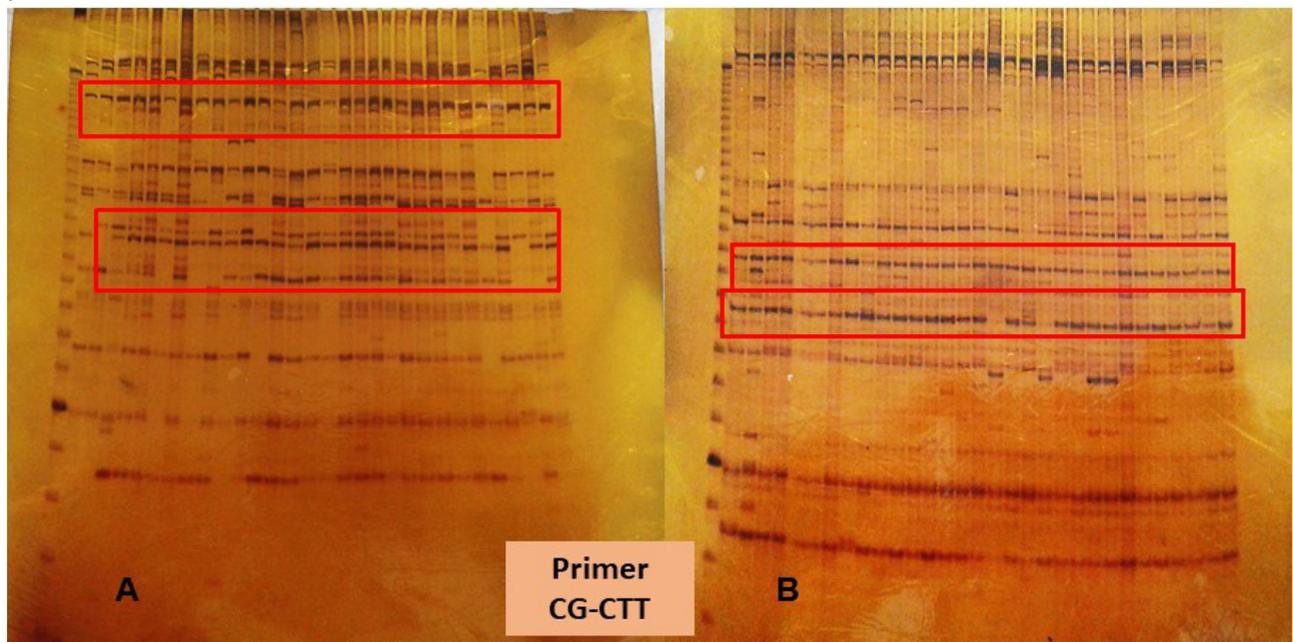


**Tabela 2.** Análise de Variância Molecular AMOVA para os morfotipos de *Conyza* spp.

Fonte de variação	G.L	Soma da variação	Componentes de variância	Varição (%)
Entre as Populações	1	1.428.517	47.34257 Va	85.18
Dentro das Populações	58	477.900	8.23966 Vb	14.82
Total	59	1906.417		

Índice de fixação FST: 0.85176

**Figura 6.** Perfil eletroforético dos biótipos A e B, com os fragmentos resultantes da amplificação com o par de primer EcoRI CG – MseI CTT.



No presente estudo, a caracterização morfológica e a molecular corroboram e se somam indicando que as plantas analisadas sejam de espécies diferentes e não apresentem plasticidade fenotípica.

## DISCUSSÃO

O gênero *Conyza* pode apresentar plasticidade fenotípica, uma mudança na expressão fenotípica em resposta a fatores ambientais o que dificulta muitas das vezes o manejo correto dessas invasoras (Paula et al., 2017).

Em nossas análises morfológicas demonstraram que os dois biótipos A e B, são as espécies *Conyza sumatrensis* e *Conyza bonariensis*, respectivamente. Essas duas espécies identificadas crescem em populações associadas e frequentes, e ambas ocorrem no Brasil, sendo comuns na região Sul e relatadas de forma contínua no estado do Paraná (Lazaroto et al., 2008; Marochio et al., 2017; Sansom, et al. 2013).

As seis combinações de primers, utilizadas no presente estudo, geraram 218 loci nas análises AFLP, e vários estudos demonstraram que a utilização de diferentes combinações de primers podem gerar quantidades variadas na amplificação de fragmentos. Em estudos com a arecácia *Butia capitata*, Buttow et al. (2010) utilizaram a combinação de quatro pares de primers gerando um total de 214 fragmentos. Franzon et al. (2009), estudando a variabilidade genética de pitangueiras, utilizando uma combinação de três primers obteve 178 fragmentos, e Karam et al. (2004), em um estudo genético de *Panicum mileacium*, com 8 pares de primers, amplificaram 450 fragmentos, apresentando um número maior de loci amplificados comparado aos resultados obtidos. Dos 218 loci amplificados, 97 foram polimórficos sendo 53 específicos para o morfotipo A e 44 para o outro morfotipo B.

Freitas et al. (2005), estudando *Myracrodruon urundeuva*, obtiveram 137 fragmentos polimórficos, e Franzon et al. (2010) obtiveram 114 loci polimórficos estudando pitangueiras, 64% do seu total de amplificações. Já Buttow alcançou um polimorfismo de 93,5% em seus estudos com *Buita capitata*, sendo esses resultados superiores ao deste trabalho. Já em Bertoni et al. (2010), em *Jacaranda decurrens* Cham., uma bignoniaceae arbórea, obtiveram um total de 205 bandas e 46,34% de polimorfismo, usando uma

combinação de quatro pares de primers, número próximo ao do presente estudo. Schiavetto et. al. (2016) em seus estudos com três populações de *Rottboellia cochinchinensis*, do estado de São Paulo, utilizando a combinação de seis primers amplificou 399 fragmentos, sendo 101 polimórficos, correspondendo a 25,3% do total amplificado.

A AMOVA mostrou que a variação molecular entre as populações foi de 85,18% (tabela 2). Estudando *Bidens pilosa* (picão-preto), no Rio Grande do Sul, e utilizando a técnica RAPD, Vidal et al. (2007) atingiram o valor médio de 38% para a similaridade genética entre os acessos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, originários de uma mesma propriedade. Winkler et al. (2003), estudando *Euphorbia heterophylla* resistente ao herbicida inibidor de acetolactato sintase, também com RAPD, obtiveram coeficiente médio de similaridade de 40%. As plantas daninhas mostram elevada variabilidade genética e baixa similaridade nas populações, uma vez que se desenvolvem e evoluem em múltiplos ambientes (Vidal et al., 2005).

O resultado encontrado em buva pode indicar alto fluxo gênico das espécies, pois estas possuem estruturas em suas sementes para dispersão em longas distâncias, chegando até 500 metros (Santos et al., 2013). A variação molecular dentro das populações foi de 14,82%, que pode ser explicada devido a exposição a herbicidas, ocasionando a diminuição da heterozigosidade. Além disso, o processo de seleção de biótipos resistentes reduz ainda mais a heterozigosidade, implicando baixos níveis de diversidade genética (Circunsvis, 2013). Schneider et. al. (2020), estudando apenas plantas de *Conyza sumatrensis*, utilizando microssatélites, observaram a presença de uma alta diversidade genética e isso indica que os biótipos podem apresentar diferentes respostas a estratégias de manejo, flutuações ambientais e que a variabilidade genética das espécies pode ser um dos fatores envolvidos nos mecanismos de resistência a herbicidas.

Os perfis de bandas obtidos por AFLP são resultantes das variações nos locais de restrição das enzimas utilizadas e da amplificação seletiva dos fragmentos de DNA (Schneider et al., 2018). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a técnica AFLP foi útil para a caracterização molecular dos biótipos de *Conyza* spp, e esses

resultados corroboram com o que Schneider et al. (2008) obtiveram. Assim, essa técnica molecular é uma ferramenta útil para estudar a variabilidade genética e estabelecer relações entre populações de plantas daninhas, uma vez que a maioria dos estudos se dá por meio do marcador molecular microsatélite (SSR), podendo então ampliar os estudos moleculares das invasoras.

O dendrograma das distâncias genéticas de Nei (1978) corrobora com o resultado da AMOVA. Essas ferramentas são uma contribuição importante para avaliações taxonômicas, corroborando com estudos morfológicos sobre identificação de espécies (Rocha et al., 2009). Em um estudo com *Commelina*, nos estados de São Paulo e Paraná, Rocha et al. (2009) obtiveram baixa taxa de polimorfismo, no entanto, demonstrando diversidade genética entre espécies, conseguindo construir quatro clusters.

Através das análises moleculares e da estrutura morfológica dos biótipos estudados, os resultados demonstram que o morfotipo A e B são, respectivamente, as espécies *Conyza sumatrensis* e *Conyza bonariensis*. Foi possível observar, ainda, que as plantas estudadas não apresentaram plasticidade fenotípica ou presença de híbridos. Por fim, a técnica AFLP é útil na diferenciação molecular de populações de plantas daninhas e, que, a partir da identificação correta das espécies, o manejo e o controle se tornam mais precisos e se evita a seleção de plantas resistentes aos herbicidas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Educação Tutorial (PET) pelo apoio financeiro, ao Laboratório de Biotecnologia da UENP/CLM pela estrutura e a todos os que colaboraram para a produção deste artigo, em especial os colegas de laboratório e professores.

## REFERÊNCIAS

Bertoni, B. W.; Telles, M. P. C.; Torres S. C. Z.; Pereira, J. O.; Lourenço, M. V.; França, S. C. and Pereira, A. M. S. Genetic diversity in natural populations of Jacaranda decurrens Cham. determined using RAPD and AFLP markers. *Genetics and Molecular Biology*, **2010**, 33, 3, 532-538.

Busato, G. R.; Grützmacher A. D.; Oliveira, A. C.; Vieira, E.A.; Zimmer, P. D.; Koop, M. M.; Bandeira, J. M. e Magalhães T. R. Análise da Estrutura e Diversidade Molecular de Populações de *Spodopterafrugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Associadas às Culturas de Milho e Arroz no Rio Grande do Sul. *Neotropical Entomology*, **2004**, 33, 6, 709-716.

Buttow, M. V.; Castro, C. M.; Schwartz, A. T. e Barbieri, R. L. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **2010**, 32, 1, 230-239.

Circunvis, B. C.; Renesto, E.; Mangolin, C. A.; Machado, M. F. P. S. e Takasusuki, M. C. C. R. Caracterização genética de amostras de *Conyza* sp. do Estado do Paraná. *Planta Daninha*, **2014**, 32, 1, 173-179.

Franzon, R. C.; Castro, C. M. e Raseira, M. C. B. Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura [online]*, **2010**, 32, 1, 240-250.

Freitas, M. L. M.; Aukar, A. P. A.; Sebbenn, A. M.; Moraes, M. L. T. e Lemos, E. G. M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. *Scientia Forestalis*, **2005**, 68, 21-28.

Karam, D.; Westra, P.; Nissen, S. J.; Ward, S. M. and Figueiredo, J. E. F. Genetic diversity among PROSO MILLET (*Panicum miliaceum*) biotypes assessed by AFLP technique. *Planta Daninha*, **2004**, 22, 2, 167-174.

Lazarotto, C. A.; Fleck, N. G. e Ribas, A. V. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). *Ciência Rural*, Santa Maria, **2008**, 38, 3, 852-860.

Lorenzi, H. Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas. 7. ed. [s.l.] *Instituto Plantarum*, **2014**.

Marochio, C. A.; Bevilaqua, M. R. R.; Takano, H. K.; Mangolim, C. A.; Oliveira, J. R. R. S. and Machado, M. F. P. Genetic admixture in species of *Conyza* (Asteraceae) as revealed by microsatellite markers. *Acta Scientiarum*, **2017**, 39, 4, 437-445.

- Paula, J. M.; Pinto-Maglio, C. A. F. e Pinto, L. R. Morphological analysis and DNA methylation in *Conyza bonariensis* L. Cronquist (Asteraceae) phenotypes. *Bragantia*, **2017**, 76, 4, 480-491.
- Rocha, D. C.; Rodella, R. A.; Marino, C. L. and Martins, D. Genetic variability among *Commelina* weed species from the states of Paraná and São Paulo, Brazil. *Planta Daninha*, **2009**, 27, 3, 421-427.
- Sansom, M.; Saborido, A. A. and Dubois, M. Control of *Conyza* spp. with Glyphosate – A Review of the Situation in Europe. *Plant Protect. Sci*, **2013**, 49, 1, 44–53.
- Santos, F. M.; Vargas, L.; Christoffoleti, P. J.; Agostinetto, D.; Martin, T. N.; Ruchel, Q. e Fernando, J. A. Estádio de desenvolvimento e superfície foliar reduzem a eficiência de chlorimuron-ethyl e glyphosate em *Conyza sumatrensis*. *Planta Daninha*, **2014**, 32, 2, 361-375.
- Santos FM, Vargas L, Christoffoletti PJ, Martin TN, Mariani F e Silva DRO. Herbicidas alternativos para o controle de *Conyza sumatrensis* (Retz.) resistentes aos inibidores da ALS e EPSPs. *Revista Ceres*, **2015**, 62, 6, 531-538.
- Santos, G.; Francischini, A. C.; Blainiski, E.; Gemelli, A. e Machado M. F. P. S. Aspectos da Biologia e da Germinação da Buva. Buva: fundamentos e recomendações para manejo. Curitiba.PR. *Omnipax*, **2013**.
- Schiavetto, A. R.; Perecin, D.; Pinto, L. R.; Azania, C. A. M.; Zera, F. S. And Melloni, M. N. G. Genetic variability of *Rottboellia cochinchinensis* populations in sugarcane fields. *Planta Daninha*, **2016**, 34, 3, 475-484.
- Schneider, T.; Rizzardi, M. A.; Brammer, S. P.; Scheffer-Basso, S. M. and Nunes, A. L. (2020). Dissimilaridade Genética entre Biótipos de *Conyza sumatrensis* Revelada por Marcadores Moleculares Microssatélites. *Planta Daninha*, **2020**. Doi: <<https://doi.org/10.1590/s0100-83582020380100018>>.
- Schneider, T.; Rizzardi, M. A.; Nunes, A. L.; Bianchi, M. A.; Brammer, S. P. e Rockenbach A. N. Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. *Revista Brasileira de Herbicidas*, **2018**, 17, 1, 12-24.
- Souza, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2015**, 17, 3, 495-503.
- Trezzi, M. M.; Vidal, R. A.; Xavier, E.; Rosin, D.; Balbinot, J. R. A. e Prates, M. A. Resistência ao glyphosate em biótipos de buva (*Conyza* spp.) das regiões Oeste e Sudoeste do Paraná. *Planta Daninha*, **2011**, 29, 1113-1120.
- Vidal, R. A.; Nunes, A. L.; Resende, L. V.; Lamego, F. P. e Silva, P. R. Análise genética de genótipos de *Bidens pilosa* através da técnica RAPD. *Scientia Agraria*, **2007**, 8, 4, 399-403.
- Vidal, R. A.; Lamego, F. P.; Resende, L. V.; Da-Silva, P. R.; Delatorre, C. A. e Trezzi, M. M. Similaridade genética entre acessos de *Bidens pilosa* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. *Planta Daninha*, **2005**, 23, 3, 551-556.
- Winkler, L. M.; Vidal, R. A. e Neto, J. F. B. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, **2003**, 38, 9, 1067-1072.