

# *Euphorbia heterophylla* L. RESISTENTE AOS HERBICIDAS INIBIDORES DE ACETOLACTATO SINTASE: II – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BIÓTIPOS DO PLANALTO DO RIO GRANDE DO SUL

*Euphorbia heterophylla* L. RESISTANT TO HERBICIDE INHIBITORS OF ACETOLACTATE SYNTHASE: II – GEOGRAPHIC DISTRIBUTION AND GENETIC CHARACTERIZATION OF BIOTYPES FROM RIO GRANDE DO SUL PLAINS

VIDAL, Ribas A. <sup>1</sup>; WINKLER, Larissa M. <sup>2</sup>

## RESUMO

Resistência das plantas daninhas aos herbicidas é a ocorrência de biótipo com habilidade herdada de sobreviver aos herbicidas eficazes no controle da espécie. Há relatos de populações de *Euphorbia heterophylla* L. resistentes aos herbicidas tradicionalmente utilizados no seu controle. Este trabalho objetivou avaliar a distribuição de populações desta espécie com resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) em propriedades localizadas nas regiões sojicultoras do planalto do Rio Grande do Sul; determinar as principais práticas agronômicas associadas à resistência; e caracterizar geneticamente algumas populações resistentes. Sementes de *E. heterophylla* foram coletadas em 45 localidades do planalto do Rio Grande do Sul, durante o ano de 2001. Em cada local os agricultores informaram as práticas culturais adotadas na condução da lavoura de soja. Análises de RAPD utilizando 30 primers foram realizadas em 40 populações provenientes do planalto norte gaúcho. Este trabalho demonstrou que populações de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores de ALS estão amplamente distribuídas no estado. A utilização contínua de herbicidas inibidores de ALS provavelmente está associada com a seleção de populações resistentes. Há baixa similaridade genética entre as populações analisadas, o que sugere que não houve dispersão de sementes ou pólen de *E. heterophylla* resistente ao herbicida no planalto do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: resistência, imazethapyr, RAPD, planta daninha.

## INTRODUÇÃO

Resistência de plantas daninhas aos herbicidas é, por definição, a ocorrência de biótipo com habilidade herdada de sobreviver aos herbicidas eficazes no controle da espécie. Sua ocorrência foi teorizada por HARPER (1956) e documentada pela primeira vez no Canadá e nos EUA em 1957 (HILTON, 1957; SWITZER, 1957). A partir de 1996 os casos de resistência tem sido documentados no Brasil, sendo registrados, em média, a cada ano uma nova espécie resistente (WINKLER & VIDAL, 2004).

No Brasil, a espécie mais preocupante é *Euphorbia heterophylla*, pois seu centro de origem abrange a região Brasil-Paraguai (KISSMANN & GROTH, 1992), apresenta densidades populacionais elevadas e devido ao impacto econômico na agricultura nacional. *E. heterophylla* está

presente em 74% das áreas de soja na região do Planalto do estado do Rio Grande do Sul. É uma espécie alógama, produz até 3.000 sementes por planta e pode reduzir o rendimento de grãos da cultura da soja em até 80% (KISSMANN & GROTH, 1992).

Os fatores que favorecem a seleção de biótipos resistentes envolvem características relacionadas às plantas daninhas, aos herbicidas e às práticas culturais. Uma das características inerentes às plantas daninhas é a diversidade genética porque se desenvolvem e evoluem num ambiente hostil. A diversidade genética é comum, principalmente, entre as plantas daninhas anuais, que são as espécies pioneiras na sucessão ecológica do ambiente agrícola. Isto explica, ao menos em parte, porque a nível mundial, a maioria dos biótipos resistentes aos herbicidas é de espécies anuais. Grande diversidade genética favorece a seleção de indivíduos resistentes aos herbicidas devido a maior probabilidade de se encontrar alelo inerentemente insensível ao produto utilizado. Da mesma forma, grandes infestações aumentam os riscos de seleção para resistência (WINKLER et al., 2002).

Este trabalho faz parte de um grande projeto que utiliza as mesmas estratégias para estudo e contenção da resistência de bactérias aos antibióticos utilizados na medicina humana, ou seja: 1) mapeia geograficamente os casos de resistência, para diagnosticar a magnitude do problema; 2) realiza a caracterização genética das populações, para prever a causa de sua disseminação, 3) propõe medidas de redução de risco de seleção de indivíduos resistentes; e 4) propõe medidas para reduzir a dispersão da resistência (se for o caso).

Marcadores moleculares do tipo RAPD (polimorfismo de DNA amplificado randomicamente) permitem caracterizar plantas e microrganismos e avaliar a diversidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie ou de diferentes espécies (WILLIAMS et al., 1990). A variação genética em *Poa annua* L. após pressão de seleção proveniente da aplicação de herbicidas foi avaliada por RAPD (SWEENEY & DANNEBERGER, 1995). A mesma técnica foi usada para detectar diferença de tolerância de *Echinochloa cruz-galli* para o herbicida quinclorac (RUTLEDGE et al., 2000) e para avaliar a influência da aplicação do herbicida na variação genética de *Sinapsis arvensis* L. (MOODIE et al., 1997). Marcadores moleculares de RAPD também foram utilizados para

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Professor Adjunto, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15.100, Porto Alegre, RS, 90001-970. Bolsista do CNPq. (e-mail: ribas.vidal@ufrgs.br)

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, Dr., UFRGS, Bolsista Recém-Doutor do CNPq. (e-mail: lari1973@ig.com.br).

(Recebido para Publicação em 20/04/2004, Aprovado em 13/10/2004)

determinar a variação genética entre indivíduos de cinco populações geograficamente separadas de *Euphorbia esula* (ROWE et al., 1997). Os autores concluíram que a similaridade genética é maior entre indivíduos dentro de uma população e que a dispersão de pólen foi facilitada dentro e entre populações muito próximas geograficamente, contribuindo para este resultado.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a distribuição de populações de *Euphorbia heterophylla* com resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) em propriedades localizadas nas regiões sojicultoras do planalto do Rio Grande do Sul; determinar as principais práticas agrônomicas associadas à resistência; e caracterizar geneticamente algumas populações resistentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de diversas plantas de *E. heterophylla* que apresentaram suspeita de resistência aos inibidores de ALS, foram coletadas por engenheiros agrônomos, em 45 lavouras de soja localizadas na região do planalto do Estado do Rio Grande do Sul, entre os meses de fevereiro e abril do ano de 2001 e enviadas para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Nesta região, a espécie daninha floresce entre os meses de janeiro e março e produz sementes maduras de fevereiro a abril. Os locais de amostragem apresentavam no mínimo 50 plantas m<sup>-2</sup> sobreviventes a aplicação de herbicidas. Aproximadamente 3.000 sementes foram coletadas em no mínimo 20 plantas distribuídas ao acaso na área. Após a coleta, os agricultores informaram as práticas de manejo utilizadas na área, tais como herbicidas utilizados nos anos antecedendo a coleta de sementes, rotação de cultura, equipamentos e sistema de preparo do solo.

Os frutos contendo as sementes foram inicialmente armazenados em sacos de papel e quando estavam devidamente secos, liberaram as sementes que foram armazenadas em temperatura ambiente. Em agosto de 2001 as sementes foram colocadas em vasos com capacidade para 300 cm<sup>3</sup> e mantidos em casa de vegetação. Sementes de plantas suscetíveis foram usadas no experimento como tratamento controle. Como substrato, utilizou-se a mistura de 33% de Argissolo Vermelho Distrófico típico, 33% de areia e 33% de turfa. Quando a maior parte das plantas apresentava-se no estágio de quatro folhas, foi aplicado 200 g ha<sup>-1</sup> do herbicida imazethapyr, com adjuvante não-iônico (0,2% v/v). Todo este procedimento foi repetido duas vezes e apenas as populações com plantas sobreviventes às duas repetições foram identificadas como resistentes.

Em 40 populações, foi coletado 0,2 g de tecido foliar para extração de DNA. A amostra do tecido foi coletada em 20 plantas de cada população, quando apresentavam quatro a cinco folhas. As folhas foram agrupadas, formando um "bulk" de DNA para cada população. O protocolo de extração foi adaptado do método CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) contendo Tris-HCl 1M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M e 1,1% de CTAB. Os reagentes SDS 20%, fenol, clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), etanol absoluto e na concentração de 70% e acetato de amônio 1 M foram utilizados em etapas sucessivas a fim de obter um DNA de qualidade, com leitura da absorbância em espectrofotômetro que variou de 1,7 a 2,0.

Trinta primers com 10 nucleotídeos de sequência arbitrária foram utilizados para verificar o polimorfismo para a espécie: OPP 05, 06, 07, 08, 09 e 10; OPE 06, 09, 10, 11, 12 e 13; OPAF 18, 19 e 20; OPAD 01, 02, 04, 08, 09, 10, 11, 17 e

18; OPAG 01, 19 e 20 e OPAI 14, 19 e 20. Reações de amplificação do DNA foram feitas através da técnica de PCR (reação em cadeia da enzima polimerase) programado para 1 min a 94°C seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C. Uma incubação de 10 min a 72°C foi incluída como passo final. As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo a solução tampão da enzima Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl e 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,24 µM de primer; 20 ng de DNA; 1,2 unidades da enzima Taq DNA polimerase. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, em solução TBE (Tris-base, ácido bórico, EDTA). Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel contendo brometo de etídio, em um transiluminador com radiação ultravioleta. A imagem foi capturada por uma câmara digital acoplada ao computador e foi usado o programa Kodak Digital Image.

As imagens fotográficas de RAPD foram avaliadas para presença (positivo) ou ausência (negativo) de fragmentos de eletroforese. Foi elaborada uma matriz contendo as populações nas linhas e os marcadores nas colunas, sendo utilizada para estimar o índice de distância genética com o programa NTSYS-pc (ROHLF, 1992). Para avaliar o grau de relacionamento entre as plantas de cada população foi elaborado fenograma através do programa NTSYS-pc, utilizando o procedimento SAHN, baseado no método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os municípios com confirmação de plantas resistentes ao herbicida testado foram Almirante Tamandaré, Augusto Pestana, Bela Vista, Carazinho, Charrua, Chiapeta, Colorado, Coxilha, Cruz Alta, Ijuí, Jóia, Marau, Mato Castelhano, Não-Me-Toque, Palmeira das Missões, Pontão, Rio Pardo, Saldanha Marinho e Santo Ângelo. Plantas de *E. heterophylla* oriundas de sementes coletadas em todos os locais sobreviveram ao imazethapyr, enquanto que plantas da população utilizada como padrão suscetível (Porto Alegre) morreram aproximadamente 25 dias após a aplicação do herbicida. Este resultado demonstra que a resistência aos herbicidas inibidores de ALS está muito distribuída na região amostrada do planalto do Rio Grande do Sul (Figura 1).

A análise dos questionários indica que 72% das amostras foram coletadas em locais onde se suspeitava de resistência há pelo menos dois anos. Este resultado não surpreende, visto que herbicidas inibidores de ALS têm sido utilizados no Rio Grande do Sul há pelo menos 15 anos e se prevê elevado incremento de casos de resistência em áreas com utilização de poucos mecanismos de ação (VIDAL & WINKLER, 2002).

O manejo do solo através do sistema de semeadura direta (popularmente chamado plantio direto) era utilizado em 91% das áreas amostradas. Deste total, 90% dos locais amostrados utilizavam este sistema de preparo há mais de cinco anos. No sistema de semeadura direta os agricultores são mais dependentes de herbicidas e tem menor possibilidade de utilizar outras técnicas de manejo de plantas daninhas. A dependência intensa de herbicidas aumenta a pressão de seleção e facilita o aparecimento de biótipos resistentes (OWEN, 2001).

No decorrer dos anos, houve redução linear da utilização de herbicidas inibidores de ALS para controle de *E.*

*heterophylla*, decrescendo de 82% para 58% dos locais amostrados, no período entre dois anos antes da coleta e o ano da amostragem, respectivamente. Simultaneamente, observou-se incremento de 6 para 22% na utilização de herbicidas inibidores de PROTOX para controlar *E.*

*heterophylla*, quando se compara o uso de herbicida dois anos antes com o ano da coleta das amostras, respectivamente. Este resultado corrobora a observação de suspeita de resistência há mais de dois anos nas áreas amostradas.

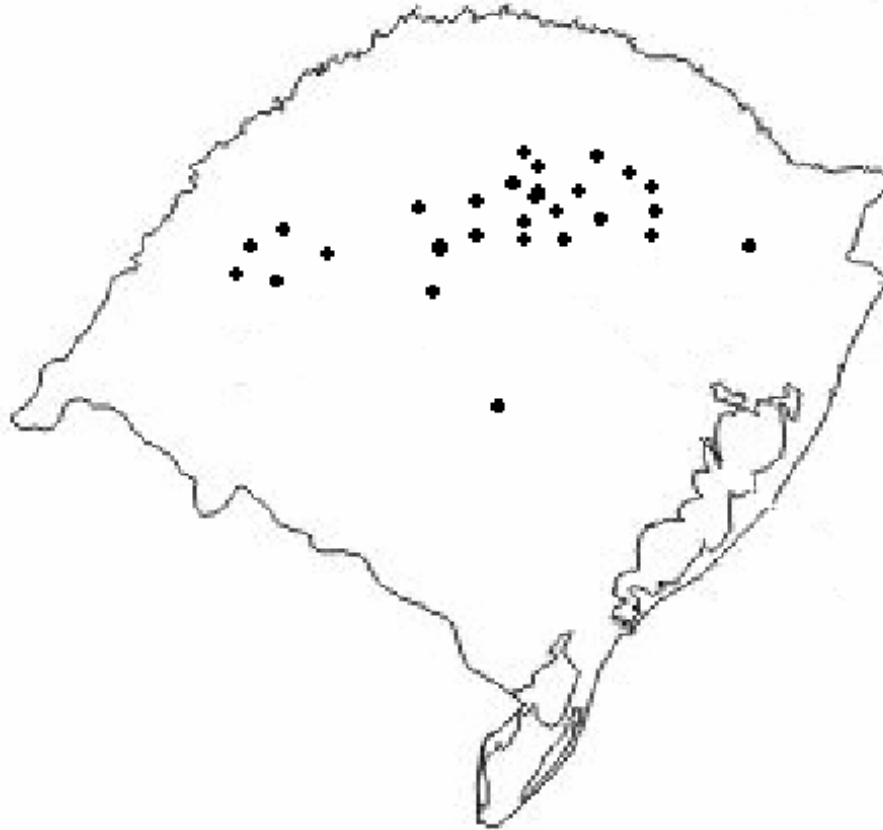


Figura 1 - Mapa do estado do Rio Grande do Sul, onde cada ponto representa a localização aproximada de dois locais de coleta de sementes de *Euphorbia heterophylla* L. em lavouras de soja.

Vários fatores afetam a taxa de evolução de biótipos resistentes numa lavoura; mas, os fatores mais importantes controlando este fenômeno são intensidade do uso de herbicidas que atuam em determinado local de ação e a frequência inicial do gene de resistência (WINKLER et al., 2002). Resultados recentes indicam que, em populações de *Lolium rigidum* nunca aspergidas com herbicidas inibidores de ALS, a frequência inicial do gene de resistência pode ser da ordem de  $10^{-4}$  (PRESTON & POWLES, 2002), explicando o rápido aparecimento de biótipos resistentes após apenas três anos de uso de herbicidas deste grupo (POWLES et al., 1997).

A maioria dos locais (75%) apresentava, nos anos anteriores à coleta de sementes, o cultivo de soja. A prática de monocultura favorece a utilização de herbicidas com mesmo mecanismo de ação durante muitos anos e acelera o desenvolvimento de resistência. A utilização de herbicidas, principalmente no sistema de semeadura direta, tornou-se método predominante no manejo de plantas daninhas. Assim, esse sistema de manejo do solo, comparado ao preparo convencional, apresenta maior risco de ocorrência de plantas resistentes devido à sua dependência do método químico para controle de plantas daninhas (BROWN, 1996). Com a

limitação nos métodos de controle, há elevação do nível de sementes de ervas presentes no solo, com subsequente elevada densidade populacional, o que aumenta a probabilidade de selecionar biótipos resistentes na área (JASIENIUK et al., 1996; VIDAL & FLECK, 1997).

Nos locais amostrados, a maioria dos agricultores possuía equipamentos de colheita próprios e não colhia para os vizinhos, de forma que a dispersão de sementes de *Euphorbia heterophylla* via colhedoras não é esperada.

Na análise com marcadores genéticos (RAPD) identificou-se 96 lócus e destes, 77 (80%) apresentaram-se polimórficos. Dos 30 marcadores utilizados, 27 amplificaram e apresentaram boa reprodutibilidade das bandas. As bandas analisadas variaram entre 200 e 2.100 pares de bases (pb). Os 27 marcadores utilizados nesta análise produziram um total de 2.437 bandas. As bandas mais frequentemente encontradas entre as populações e os primers analisados corresponderam ao fragmento de 900,600 e 800 pb, que ocorreram em 9,6; 9,4 e 9,0% do total, respectivamente. Esta análise mostra que a probabilidade destes fragmentos estarem associados à característica de resistência é maior do que

aqueles fragmentos de 200 e 1.350 pb, ambos com 0,04% de ocorrência e que foram considerados raros.

Nas 40 populações testadas, o número de fragmentos gerados por marcador variou de 13 a 185, com média de 90 bandas por marcador. A utilização de marcadores moleculares de RAPD possibilitou a identificação de coeficiente de similaridade igual a 40% entre as populações testadas. Vasconcelos et al. (2000) também encontraram para *E. heterophylla* valor de distância genética de 39%, considerado baixo sugerindo isolamento reprodutivo entre as populações testadas. Da mesma forma, RUTLEDGE et al. (2000) observaram em *Echinochloa crus-galli* distância genética de 43% entre 16 populações analisadas. No entanto, acessos de *Eichornia crassipes* (aguapé) apresentaram similaridade genética elevada (90%), perfeitamente explicável pela forma de propagação vegetativa, a qual diminui a possibilidade de recombinação genética (CARDOSO et al., 2002).

Pela análise de agrupamento hierárquico, as populações foram separadas em sete grupos distintos (Figura 2). No Grupo 1 estavam compreendidas populações oriundas dos municípios de Bela Vista (06, 07 e 08); Pontão (09), Não-Me-Toque (13 e 14), Coxilha (17, 18 e 19), Santo Ângelo (20), Charrua (21 e 22) e Almirante Tamandaré (23 e 24). O Grupo 2 continha uma população de Pontão (11). No Grupo 3 estavam dois biótipos originários de Rio Pardo (15 e 16). No Grupo 4 estava uma população de Pontão (10). O Grupo 5 tinha populações dos municípios de Almirante Tamandaré (25), Saldanha Marinho (26, 27 e 28), Colorado (29, 30 e 31), Ijuí (33), Marau (34), Palmeira das Missões (36, 37 e 38), Cruz Alta (39), Jóia (40), Chiapeta (41), Carazinho (42), Porto Alegre (43) e Mato Castelhana (45, 46 e 47). No Grupo 6 continha população de Augusto Pestana (35). Finalmente no Grupo 7 estava uma população de Não-Me-Toque (12) (Figura 2).

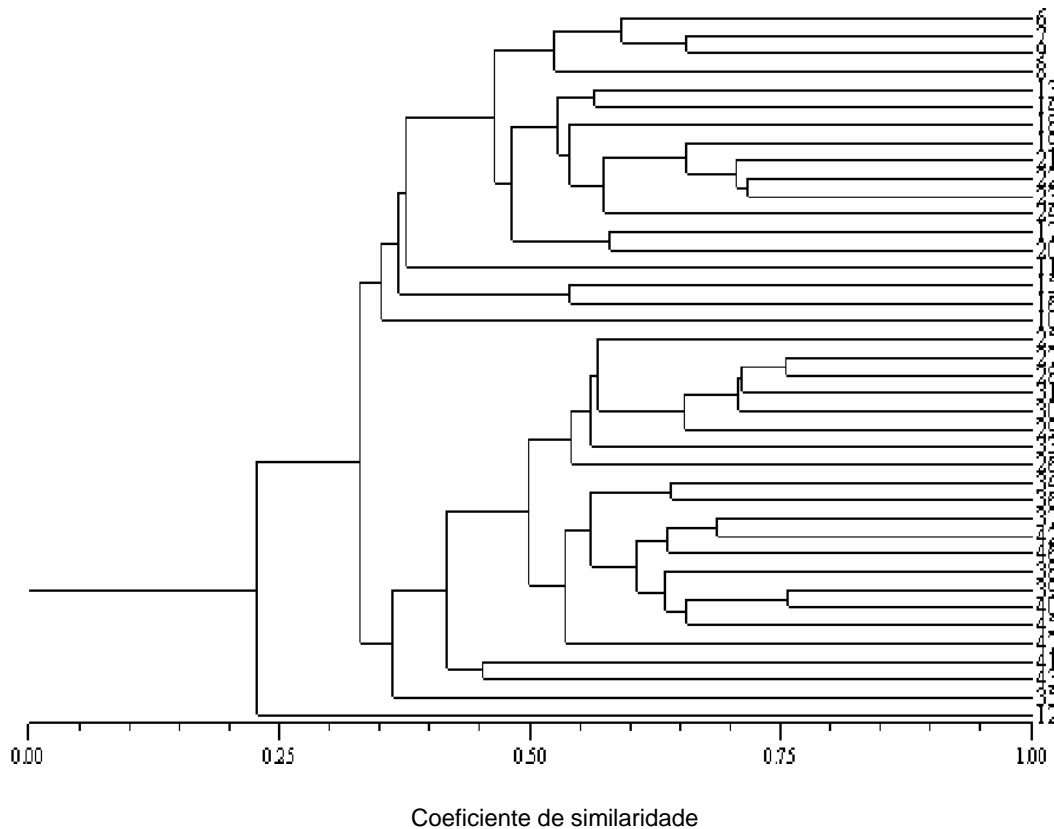


Figura 2 - Fenograma de similaridade genética entre 40 populações de *Euphorbia heterophylla* L. do estado do Rio Grande do Sul. Coeficiente de similaridade médio de 40%.

A análise sugere que os sete grupos estão isolados reprodutivamente. Os resultados ainda permitem especular que provavelmente o fluxo gênico entre as populações avaliadas é reduzido. Se isto for comprovado em estudos posteriores, o controle dos focos de resistência será facilitado, pois indica que não houve dispersão de sementes de *E. heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores de ALS na região analisada. Sabe-se que essa espécie apresenta deiscência de sementes via bolocoria (sementes liberadas pela fragmentação explosiva do fruto) cerca de um mês antes da colheita da soja (KISSMANN & GROTH, 1992). Isto tornaria

improvável a disseminação das sementes da erva junto às sementes da cultura. Da mesma forma, especula-se baixa dispersão da resistência pelo pólen das plantas. Assim, medidas de contenção da disseminação da resistência, como quarentena das áreas problema, não seriam necessárias. A baixa similaridade genética entre as populações indica que este tipo de resistência não está se espalhando no planalto do estado, mas provavelmente está sendo selecionada localmente em cada propriedade pelo uso continuado de herbicidas inibidores da enzima ALS.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam elevada distribuição geográfica de populações de *Euphorbia heterophylla* resistente aos inibidores de ALS na região do planalto do estado do Rio Grande do Sul. A utilização prolongada de herbicidas inibidores de enzima acetolactato sintase provavelmente está associada com a seleção de populações resistentes. Há baixa similaridade genética entre as populações analisadas.

## AGRADECIMENTOS

Aos estudantes Gustavo C. Hernandez, Israel R. Silva e Fernanda Camozato, pelo apoio na condução dos experimentos. Ao Sr. José A. Anjos, pela datilografia do trabalho. Ao CNPq, FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa.

## ABSTRACT

*Herbicide resistance is the occurrence of biotypes with heritable ability to survive herbicides that control the species. Reports indicates wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) biotypes to be resistant to the herbicides traditionally used for its control. This work was designed to evaluate the distribution of *E. heterophylla* resistant to herbicides inhibitors of acetolactate synthase (ALS) in farms located in the soybean growing area of the state of Rio Grande do Sul; to determine the major contributing agronomic causes for weed resistance selection; and to characterize genetically some resistant populations of this species. *E. heterophylla* seeds were sampled in 45 sites located in Rio Grande do Sul state, during 2001. On each site, farmers informed soybean management practices adopted. RAPD analysis using 30 primers were performed on forty *E. heterophylla* populations. This survey demonstrated ALS resistant *E. heterophylla* biotypes are widely distributed in the state. The single contributing factor for the selection of resistant biotypes was the frequent use of ALS-inhibiting herbicides on years preceding the sampling. The genetic analysis demonstrates low genetic similarity among populations analyzed, suggesting low dispersal of the resistant populations around the region.*

Key words: resistance, imazethapyr, weed, RAPD

## REFERÊNCIA

BROWN, T.M. **Molecular genetics and evolution of pesticide resistance**. Washington: ACS, 1996. 340p.  
CARDOSO, L.R.; MARTINS, D.; KURAMAR, E.E. et al. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no estado de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, v.20, p.1-5, 2002.  
HARPER, J.L. The evolution of weeds in relation to resistance to herbicides. In: BRITISH WEED CONTROL CONFERENCE, 3., 1956, Brighton. **Proceedings...** Brighton: BCPC, 1956. p.179-188.  
HILTON, H.W. Herbicide tolerant strains of weeds. **HSCPA Annual Report**, 1957. p.66.

JASIENIUK, M.; BRULE-BABEL, A.L.; MORRISON, I.N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, Champaign, v.44, n.2, p.176-193, 1996.  
KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1992. 798p.  
MOODIE, M.; FINCH, P.R.; MARSHALL, G. Analysis of genetic variation in wild mustard (*Sinapsis arvensis* L.) using molecular markers. **Weed Science**, Lawrence, v.45, n.3, p. 102-107, 1997.  
OWEN, M.D.K. World maize/soybean herbicide resistance. In: POWLES, S.B.; SHANER, D.L. **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 101-164.  
POWLES, S.B.; PRESTON, C.; BRYAN, I.B. et al. Herbicide resistance: impact and management. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.58, n. 1, p.57-93, 1997.  
PRESTON, C.; POWLES, S.B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, London, v.88, n.1, p.8-13, 2002.  
ROHLF, F.S. **NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Exeter software, Setauket, NY. 1992.  
ROWE, M.L.; LEE, D.J.; NISSEN, S.J.; Genetic variation in North American leafy spurge (*Euphorbia esula*) determined by DNA markers. **Weed Science**, v. 45, n. 3, p. 446-454, 1997.  
RUTLEDGE, J.; TALBERT, R.E.; SNELLER, C.H. RAPD analysis of genetic variation among propanil-resistant and susceptible *Echinochloa crus-galli* populations in Arkansas. **Weed Science**, Lawrence, v.48, n.6, p.669-674, 2000.  
SWEENEY, P.M.; DANNEBERGER, T.K. RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. **Crop Science**, Madison, v.35, n.6, p.1676-1680, 1995.  
SWITZER, C.M. The existence of 2,4-D resistant strains of wild carrot (*Daucus carota*). Meeting of the NEWSS,II, 1957. **Proceedings...** NEWSS, 1957. p.315-318.  
VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, Botucatu, v.15, n.1-2, p.152-161, 1997.  
VIDAL, R.A.; WINKLER, L.M. Resistência de plantas daninhas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactato sintase (ALS). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.12, n.1, p.31-42, 2002.  
WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.  
WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: Distribuição e genética de biótipos do estado do Paraná. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 14, n. 1, no prelo, 2004.  
WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v.70, n.4, p.21-24, 2002.