

# *Euphorbia heterophylla* L. RESISTENTE AOS HERBICIDAS INIBIDORES DE ACETOLACTATO SINTASE: DISTRIBUIÇÃO E GENÉTICA DE BIÓTIPOS DO ESTADO DO PARANÁ

LARISSA MACEDO WINKLER \*  
RIBAS ANTONIO VIDAL \*\*

---

Avaliou-se a distribuição de populações da espécie *Euphorbia heterophylla* L., com resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), em propriedades localizadas nas regiões oeste e sudeste do estado do Paraná. Foram determinadas as principais práticas agronômicas associadas à resistência e caracterizadas populações resistentes geneticamente. Sementes de *E. heterophylla* foram coletadas em 103 localidades do estado do Paraná, durante o ano de 2002. Em cada local os agricultores informaram as práticas culturais adotadas na condução da lavoura de soja. Análises de *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) utilizando 30 *primers* foram realizadas em cinco populações provenientes do oeste paranaense. Os resultados evidenciaram que populações de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores de ALS estão amplamente distribuídas no estado do Paraná. A monocultura de soja conjuntamente com a utilização prolongada de herbicidas inibidores de ALS, provavelmente, estão associadas com a seleção de populações resistentes. A análise genética não permitiu assegurar se houve dispersão de sementes de *E. heterophylla* resistente ao herbicida na região analisada.

**PALAVRAS-CHAVE:** HERBICIDAS; *Euphorbia heterophylla* L.; SIMILARIDADE GENÉTICA; RAPD.

---

\* Engenheira Agrônoma, Doutora em Ciências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Bolsista Recém-Doutor do CNPq, Porto Alegre, RS (e-mail: lari1973@ig.com.br).

\*\* Engenheiro Agrônomo, Ph. D. em Weed Science, Professor Adjunto, Faculdade de Agronomia da UFRGS; Bolsista do CNPq, Porto Alegre, RS (e-mail: ribas.vidal@ufrgs.br).

## 1 INTRODUÇÃO

A planta daninha *Euphorbia heterophylla* L., conhecida popularmente como leiteira ou amendoim bravo, tem seu centro de origem compreendido na região Brasil-Paraguai (KISSMANN e GROTH, 1992) e está amplamente distribuída no centro-sul do Brasil. Em levantamento efetuado no planalto do estado do Rio Grande do Sul foi constatado que 74% das áreas de soja apresentavam-se infestadas com essa espécie (BIANCHI, 1996). Em lavouras de soja, cada 10 plantas de *E. heterophylla*/m<sup>2</sup> reduzem 7% no rendimento de grãos quando o período de convivência entre as espécies dura todo o ciclo da cultura (CHEMALE e FLECK, 1982).

Desde 1986, o controle de *E. heterophylla* tem sido realizado, principalmente, com herbicidas inibidores das enzimas acetolactato sintase (ALS) (VIDAL e MEROTTO JR, 2001). Contudo, na última década ocorreu o aparecimento de biótipos da espécie resistente aos inibidores de ALS no Brasil (VIDAL e MEROTTO JR, 1999; GAZZIERO et al., 1998). Ainda não existem publicações na literatura científica que identifiquem a distribuição geográfica de *E. heterophylla* no Brasil. Em outros países, diversos trabalhos indicam que a distribuição de plantas daninhas resistentes apresenta ampla dispersão nas áreas agrícolas (BOURGEOIS e MORRISON, 1997; BOURGEOIS, MORRISON e KELNER, 1997; BECKIE et al., 1999; LÉGÈRE et al., 2000; LLEWELLYN e POWLES, 2001).

Um único gene, dominante e com herança nuclear confere resistência aos inibidores de ALS em *E. heterophylla* (VARGAS et al., 2001). A caracterização genética das populações de leiteira resistentes aos inibidores de ALS permitirá identificar se a resistência ocorreu, simultaneamente, em diversos locais ou se houve evento de seleção que se disseminou para diversas áreas do País mediante dispersão de pólen/semente.

Marcadores do tipo *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) permitem caracterizar plantas e microrganismos e avaliar a diversidade genética entre indivíduos da mesma espécie ou de diferentes espécies (WILLIAMS et al., 1990). Técnicas de RAPD foram utilizadas para verificar a variabilidade genética em *Poa annua* L., causada pela pressão de seleção proveniente de aplicação de herbicidas (SWEENEY e DANNEBERGER, 1995). A mesma técnica foi usada para avaliar a influência da aplicação de herbicidas na variação genética de *Sinapsis arvensis* L. (MOODIE, FINCH e MARCHAL, 1997).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a distribuição de populações de *E. heterophylla* com resistência aos herbicidas inibidores de ALS, em propriedades localizadas nas regiões oeste e sudeste do estado do Paraná, determinar as principais práticas agrônômicas associadas à resistência e caracterizar populações resistentes geneticamente.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

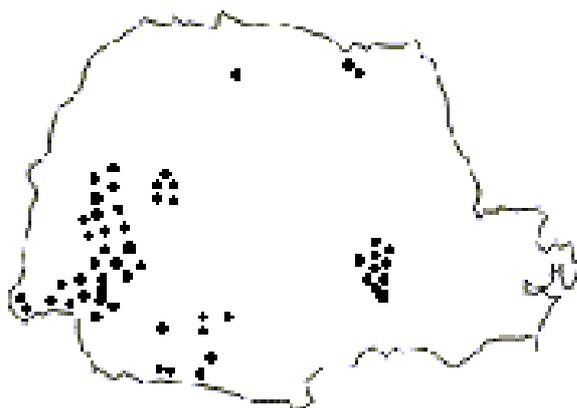
Sementes de diversas plantas de *Euphorbia heterophylla*, que apresentaram suspeita de resistência aos inibidores de ALS, foram coletadas por engenheiros agrônomos em 103 lavouras de soja, localizadas em 48 municípios das regiões oeste e sudeste do estado do Paraná (Figura 1).

A coleta ocorreu entre os meses de fevereiro e abril de 2002, sendo as amostras enviadas para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Nessa 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 do herbicida. Aproximadamente, 3000 sementes foram coletados em no mínimo 20 plantas distribuídas ao acaso na área. Após a coleta das sementes, os agricultores responderam as perguntas contidas no Quadro 1.

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 2002, 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 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 imazetapir, com adjuvante não-iônico (0,2% v/v). Todo o procedimento foi repetido duas vezes e apenas as populações com plantas sobreviventes às duas repetições foram identificadas como resistentes.

**FIGURA 1 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ EM QUE CADA PONTO REPRESENTA A LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DE 2 LOCAIS DE COLETA DE SEMENTES DE *Euphorbia heterophylla* EM LAVOURAS DE SOJA**



**QUADRO 1 - QUESTIONÁRIO PREENCHIDO APÓS A COLETA DE FRUTOS/SEMENTES DE *Euphorbia heterophylla* PARA ANALISAR FATORES AGRONÔMICOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA**

<b>Informações da propriedade</b>		
Nome:	Tamanho:	Telefone:
Proprietário:	Município:	Estado:
Sistema de preparo do solo (direto/convencional):		Anos neste sistema:
<b>Informações sobre o controle de ervas</b>		
Número de anos com suspeita de resistência:		Tamanho da área suspeita:
Último herbicida usado:	Dose:	Surfactantes:
Outros herbicidas usados na safra:	Dose:	Surfactantes:
Herbicidas usados no verão anterior:		Herbicida usado 2 vezes antes:
<b>Informações sobre a cultura</b>		
Cultura no verão passado:		Cultura há 2 verões:
<b>Informações sobre a colheita</b>		
Possui equipamento (sim/não)		Colhe para vizinhos (sim/não)

Cinco populações que apresentaram resistência ao herbicida foram selecionadas, representando os municípios de Assis Chateaubriand, Maripá, Palotina e Toledo (2 amostras) para o trabalho de caracterização genética. Amostras de 0,2 g de tecido foliar para extração de DNA foram coletadas em 20 plantas, de cada população, quando apresentavam quatro a cinco folhas. As folhas foram agrupadas, formando “bulk” de DNA para cada população. O protocolo de extração foi adaptado do método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), contendo Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M 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 1M foram utilizados em etapas sucessivas a fim de obter DNA de qualidade. Efetuou-se a leitura e cálculo dos comprimentos de onda do DNA, em nanômetros (nm), que variaram de 1,7 a 2,0 através dos valores de absorvância obtidos em espectrofotômetro “Spectronic Genesys 2”.

Trinta *primers* com 10 nucleotídeos de seqüência arbitrária foram utilizados para verificar o polimorfismo para a espécie: OPP 05, 06, 07, 08, 09, 10; OPE 06,09, 10, 11, 12, 13; OPAF 18, 19, 20; OPAD 01, 02, 04, 08, 09, 10, 11, 17, 18; OPAG 01, 19, 20 e OPAI 14, 19, 20. Reações de amplificação do DNA foram feitas pela técnica de reação em cadeia da enzima polimerase (PCR), 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 etapa de extensão da cadeia de DNA por 10 min a 72°C foi incluída como passo final. As reações foram preparadas para 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 e 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 transiluminador com radiação ultravioleta. A imagem foi capturada em câmara digital acoplada ao computador, sendo usado o programa Kodak Digital Image.

Avaliou-se a presença ou ausência de bandas. O coeficiente de Jaccard foi usado para a construção da matriz de distâncias genéticas. A partir desses dados foi elaborado fenograma pelo método *unweighted pair groups method with arithmetic mean* (UPGMA) de agrupamento hierárquico, com o auxílio do programa computacional NTSYS (ROHLF, 2000).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas resistentes ao herbicida testado foram confirmadas nos municípios de Anahy, Assis Chateaubriand, Boa Vista do Toldo, Braganey, Cafelândia, Campina da Lagoa, Campo Bonito, Capanema, Capitão Leônidas Marques, Cascavel, Catanduvas, Céu Azul, Chopinzinho, Corbélia, Encantado do Oeste 1, Espigão Alto do Iguaçu, Formosa do Oeste, Goioerê, Guaraniaçu, Iguatu, Jesuítas, Juranda, Maripá, Nova Aurora, Nova Cantu, Palotina, Palmeira, Pérola do Oeste, Quarto Centenário, Quedas do Iguaçu, Realeza, Santa Isabel do Oeste, Santa Tereza do Oeste, São Miguel do Iguaçu, Três Barras do Paraná, Uiratã, Vera Cruz do Oeste, Verê e Vitorino. Plantas de *E. heterophylla*, oriundas de sementes coletadas em todos os locais sobreviveram ao herbicida testado, enquanto que a população utilizada como padrão suscetível morreu aproximadamente 25 dias após a aplicação do herbicida. Esse resultado evidencia que populações de *E. heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores de ALS estão amplamente distribuídas na região amostrada do estado do Paraná (Figura 1).

A análise dos questionários indicou que 72% das amostras foram coletadas em locais com suspeita de resistência há mais de 2 anos. Tal resultado não surpreende, visto que herbicidas inibidores de ALS têm sido utilizados no Paraná por pelo menos 15 anos. Já foi previsto elevado incremento no número de casos de resistência em áreas com utilização de produtos com os mesmos mecanismos de ação (VIDAL e WINKLER, 2002).

O sistema de preparo do solo com semeadura direta (popularmente chamado plantio direto), verificado em todos os locais amostrados, tem sido usado por 76% dos agricultores por mais de 5 anos. Nesse sistema de preparo do solo, os agricultores são mais dependentes de herbicidas e quase não utilizam outras técnicas de manejo de ervas. A dependência intensa de herbicidas aumenta a pressão de seleção de biótipos resistentes aos mesmos nesse sistema de preparo (OWEN, 2001).

Houve utilização muito intensa (78%) de herbicidas inibidores de ALS no ano da coleta de amostras, não sendo constatada variação em relação aos anos anteriores. Entretanto, a necessidade de utilizar o segundo herbicida para controlar *E. heterophylla* cresceu de 63 para 82%, quando se compara o uso de herbicida dois anos antes da coleta das amostras. Tal resultado confirma a existência de suspeita de resistência há mais de 2 anos nas áreas amostradas. Infelizmente, o segundo herbicida utilizado em 63% das áreas também pertencia ao grupo dos inibidores de ALS. Vários fatores afetam a taxa de evolução de biótipos resistentes na lavoura, mas os mais importantes envolvem a intensidade do uso de herbicidas com o mesmo tipo de ação e a frequência inicial do gene de resistência (WINKLER e BARBOSA NETO, 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 e POWLES, 2002). Tal fato explica o rápido aparecimento de biótipos resistentes após apenas 3 anos de uso de herbicidas desse grupo (POWLES et al., 1997).

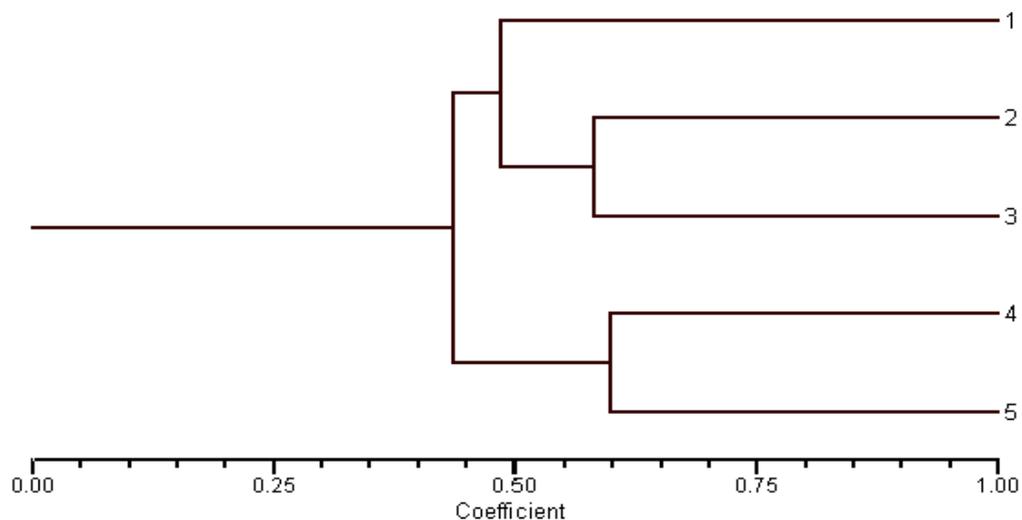
A maioria dos locais (90%), nos anos anteriores à coleta de amostras, era usada para cultivo de soja. As comunidades infestantes, que se desenvolvem em monocultura, tendem a apresentar elevado banco de sementes de ervas devido à limitação nas alternativas de mecanismos de ação de herbicidas disponíveis para seu controle (OWEN, 2001). Com elevado banco de sementes ocorre alta densidade populacional, o que aumenta a probabilidade de seleção de biótipos resistentes na área (JASIENIUK, BRÛLÉ-BABEL e MORRISON, 1996; VIDAL e FLECK, 1997). A maioria dos agricultores dos locais amostrados possuía equipamentos de colheita próprio e não efetuava a colheita para os vizinhos. Assim, a dispersão de sementes de ervas via sementes da cultura não era esperada.

Na análise com marcadores genéticos (RAPD) foram identificados 96 loci, dos quais 77 (80%) apresentaram-se polimórficos. Dos 30 marcadores utilizados, 24 amplificaram e apresentaram boa reprodutibilidade das bandas. As bandas analisadas variaram entre 300 e 2000 pares de bases (pb). Os 24 marcadores utilizados nessa análise produziram o total de 265 bandas. Das 265 bandas avaliadas, 32 (12%) corresponderam ao fragmento de 600 pb, 30 (11%) ao fragmento de 800 pb e 22 (8%) aos fragmentos de 1100 e 1000 pb, constituindo as bandas mais comumente encontradas. Tal resultado evidencia que a probabilidade desses fragmentos estarem associados à característica de resistência é maior que nos fragmentos de 1450 pb, 400 pb e 300 pb, todos considerados raros com 0,37% de ocorrência.

Nas cinco populações testadas, o número de fragmentos gerados por marcador variou de 3 a 24, com média de 11 bandas por marcador. A utilização de marcadores moleculares de RAPD possibilitou a identificação de coeficiente de similaridade de 43% entre as cinco populações do oeste do estado do Paraná testadas. Pela análise de agrupamento hierárquico as populações foram separadas em dois grupos distintos, o primeiro representado pelas populações 1 e 2 do município de Toledo e pela população 3 do município de Palotina. O segundo grupo foi representado pelas populações 4 e 5 dos municípios de Maripá e Assis Chateaubriand, respectivamente (Figura 2).

A análise genética não permitiu assegurar se houve dispersão de sementes de *E. heterophylla* resistente ao herbicida na região analisada. Sabe-se que a espécie apresenta deiscência de sementes via bolocoria (sementes liberadas pela auto fragmentação do fruto) cerca de um mês antes da colheita da cultura (KISSMANN e GROTH, 1992). Isto tornaria improvável a disseminação das sementes da erva junto com a semente da cultura. O transporte de semente junto ao maquinário de preparo do solo ou de semeadura, antes ou após os eventos de seleção de populações resistentes, pode ter contribuído para a similaridade genética nas populações provenientes de municípios vizinhos. Contudo, há necessidade de análise genética com mais populações para esclarecer esse ponto.

**FIGURA 2 - FENOGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE 5 POPULAÇÕES DE *Euphorbia heterophylla* L. DO ESTADO DO PARANÁ, COM COEFICIENTE MÉDIO DE SIMILARIDADE IGUAL A 43% (POPULAÇÕES: 1 E 2 = MUNICÍPIO DE TOLEDO; 3 = PALOTINA; 4 = MARIPÁ; E 5 = ASSIS CHATEAUBRIAND)**



#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que populações de *Euphorbia heterophylla* resistentes aos herbicidas inibidores de ALS estão amplamente distribuídas no estado do Paraná. Diversas práticas agronômicas têm favorecido a seleção dos biótipos resistentes, destacando-se a monocultura de soja e a utilização prolongada de herbicidas com um único mecanismo de ação. A análise genética não permitiu assegurar se houve dispersão de sementes de *E. heterophylla* resistente ao herbicida na região analisada.

#### ABSTRACT

***Euphorbia heterophylla* L. RESISTANT TO ACETOLACTATE SYNTHASE INHIBITING HERBICIDES: DISTRIBUTION AND GENETIC OF BIOTYPES FROM PARANÁ STATE**

The distribution of *Euphorbia heterophylla* L. species population resistant to acetolactate synthase inhibiting herbicides were evaluated in properties located in the west and southeast of the state of Paraná. The main agronomical practices associated to the resistant and the characterization of the population genetically resistant were determined. *E. heterophylla* seeds were collected in 103 locations of Paraná state, during the year of 2002. In each location, farmers informed soybean management practices adopted. RAPD analysis using 30 primers were performed on five populations of the west of the state. The results evidenced that the *E. heterophylla* populations resistant to the ALS inhibiting herbicides of are widely distributed in Paraná state. Soybean monoculture together with the prolonged utilization of ALS inhibiting herbicides, probably are associated with resistant population selection. The genetic analysis didn't permit to assure if there were dispersion of *E. heterophylla* seeds resistant to the herbicide in the region analysed.

**KEY-WORDS:** HERBICIDES; *Euphorbia heterophylla* L., GENETIC SIMILARITY; RAPD.

#### REFERÊNCIAS

- 1 BECKIE, H. J.; THOMAS, A.G.; LÉGERÉ, A.; KELNER, D.J.; VANACKER, R.C.; MEERS, S. Nature, occurrence, and

- cost of herbicide-resistant wild oat (*Avena fatua*) in small-grain production areas. **Weed Technology**, Lawrence, v.13, n.3, p.612-625, 1999.
- 2 BIANCHI, M.A. Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 23, Porto Alegre, RS. **Ata e Resumos...** Porto Alegre:UFRGS, 1996. 125p.
  - 3 BOURGEOIS, L.; MORRISON, I.N. A survey of ACCase inhibitor resistant wild oat in a high risk township in Manitoba. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.77, n.4, p.703-708, 1997.
  - 4 BOURGEOIS, L.; MORRISON, I.N.; KELNER, D. F Field and producer survey of ACCase resistant wild oat in Manitoba. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.77, n.4, p.709-715, 1997.
  - 5 CHEMALE, V.M.; FLECK, N.G. Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em competição com *Euphorbia heterophylla* L. sob três densidades e dois períodos de ocorrência. **Planta Daninha**, Campinas, v.5, p. 36-45, 1982.
  - 6 GAZZIERO, D.L.P.; BRIGHENTI, A.M.; MACIEL, C.D.G.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; ADEGAS, F.S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 117-125, 1998.
  - 7 JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-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.
  - 8 KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1992. v. 2, p.647-653.
  - 9 LÈGÈRE, A.; BECKIE, H. J.; STEVENSON, F.C.; THOMAS, A.G. Survey of management practices affecting the occurrence of wild oat (*Avena fatua*) resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibitors. **Weed Technology**, Lawrence, v.14, n.2, p.366-376, 2000.
  - 10 LLEWELLYN, L.S.; POWLES, S.B. High levels of herbicide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in the wheat belt of western Australia. **Weed Technology**, Lawrence, v.15, n.2, p.242-248, 2001.
  - 11 MOODIE, M.; FINCH, P. R.; MARSHALL, G. Analysis of genetic variation in wild mustard (*Sinapsis arvensis* L.) using molecular markers. **Weed Science**, Champaign, v.45, n.3, p.102-107, 1997.
  - 12 OWEN, M.D.K. World maize/soybean herbicide resistance. In: POWLES, S.B.; SHANER, D.L. **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC, 2001. p.101-164.
  - 13 POWLES, S.B.; PRESTON, C.; BRYAN, I.B.; JUTSUM, A.R. Herbicide resistance: impact and management. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 58, n.1, p.57-93, 1997.
  - 14 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.
  - 15 ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Port Jefferson, New York: Applied Biostatistics, 2000. 38 p.
  - 16 SWEENEY, P. M.; DANNEBERGER, T. K. RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. **Crop Science**, v.35, n.6, p.1676-1680, 1995.
  - 17 VARGAS, L.; BORÉN, A.; SILVA, A.A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.3, p.331-336, 2001.
  - 18 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.12, p.152-161, 1997.
  - 19 VIDAL, R.A.; MEROTTO JR., A. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. **Planta Daninha**, Botucatu, v.17, n.3, p.367-373, 1999.
  - 20 VIDAL, R. A.; MEROTTO JR., A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152 p.
  - 21 VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. Resistência de plantas daninhas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactato sintase (ALS). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 12, p. 31-42, 2002.
  - 22 WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. D. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
  - 23 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.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos estudantes Gustavo C. Hernandez; Israel R. Silva e Fernanda Camozato pelo apoio na condução dos experimentos. Ao CNPq, FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa.